

UNIVERSIDAD DE GRANADA

Escuela de Doctorado de Ciencias de la Salud



PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA

**ESTUDIO DE LA RELACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS DE MICA
Y HLA-B CON LA ALOPECIA AREATA**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR

Carlos Gustavo Mingorance Gámez

Director

Miguel Ángel López-Nevot

Granada, 2020

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales

Autor: Carlos Gustavo Mingorance Gámez

ISBN: 978-84-1306-712-4

URI: <http://hdl.handle.net/10481/65332>

If you can't explain it simply, you don't understand it well enough.

(Si no puedes explicarlo con sencillez, no lo comprendes lo suficiente)

-Albert Einstein

AGRADECIMIENTOS

Llegamos finalmente al término de un largo viaje. Tras muchos años de constancia y decepciones, este trabajo por fin ve la luz. Hubo momentos (afortunadamente breves) en los que tuve la tentación de rendirme al no ver la luz al final del túnel, y probablemente lo habría hecho si no hubiera sido por el apoyo de quienes me rodean.

Este largo camino me ha visto rodeado de varios grupos de personas, y en muchos casos han sido para mí como mi familia en las distintas etapas y entornos en los que me he visto durante la realización de este trabajo. Será una de las tareas más arduas hacer justicia a la aportación de todos los que contribuyeron a esta experiencia vital.

Esta tesis, en resumen, no habría sido posible sin la ayuda de mucha gente. Algunas personas hicieron aportaciones más obvias que otras, pero aun aquellos gestos más sutiles han sido una ayuda inestimable. Me enfrento ahora a la dura tarea de tratar de hacer justicia a todas estas personas en una medida suficiente.

Comienzo por quienes participaron en el principio del proceso activo de investigación. Los dermatólogos Jesús Tercedor y Salvador Arias-Santiago, que proporcionaron parte de los pacientes y, sobre todo, Elena García-Lora, que aparte de aportar el resto, me trató y curó mi alopecia areata. Una parte muy especial de este trabajo la dedico a ella en mi deseo de que quien me liberó de esta enfermedad goce de salud en el futuro; aunque al no ser médico de formación tengo que conformarme con deseárselo y no pueda devolverle el favor física y literalmente.

Toñi Moreno es la técnica de laboratorio que se encargó de la mayor parte del procesado, además de ser una gran amiga y una de mis anclas en Granada. Dentro y fuera del laboratorio ha sido insustituible en todo momento y, aunque la vida nos ha distanciado geográficamente, todo lo que he aprendido de ella en uno u otro aspecto ha dejado una huella imborrable en mí.

También Toñi Martín, técnica de laboratorio asistencial de HLA, fue una gran ayuda; no solo durante mi paso como residente por dicha sección, sino

por los conocimientos técnicos que aprendí de ella y se aplican en la presente tesis y el procesamiento de muestras con el que continuó tras la partida de Toñi Moreno. También Nayra Grande e Irene García, en su breve paso por el laboratorio, ayudaron en el procesamiento de muchas de estas muestras; y aunque la vida las hizo seguir rápidamente su camino, no puedo pasar por alto su inestimable aportación.

Mi compañera residente Alba Martínez, precediéndome en veteranía por un año y con un talento para la labor asistencial del que me gustaría inspirarme para mejorar lo más posible, colaboró con su ejemplo y ayuda en el apartado estadístico, pero me marcó mucho más su amistad y su carácter, que marcaron tres grandes años de mi experiencia como residente.

Nuestra predecesora Irene Gázquez sentó para nosotros las bases de la técnica que usamos en esta tesis. Una persona encantadora a la que conocí un poco tarde para conocerla bien, pero a quien aun así cuento entre mis amigas.

De entre los autores, he dejado para el final a mi tutor y director Miguel Ángel López-Nevot. La persona detrás de la idea original de esta investigación y quien ha estado evaluando en primera línea la calidad de mi trabajo; pero además mi tutor durante mis años de formación como inmunólogo. Una personalidad única y una mente inquieta que me ha alentado a seguir los pasos que me indica mi curiosidad más allá de lo que implica esta tesis. Con él he aprendido paciencia y constancia, y a desarrollar mis normalmente escuetas explicaciones.

Hay que agradecer también a los pacientes y controles que se prestaron a participar en nuestra investigación. Sin ellos no habría literalmente nada que investigar y todo habría quedado en una pregunta sin respuesta o con respuestas teóricas a lo sumo.

Mucha más gente me apoyó o inspiró durante mi periodo de formación en el hospital. Junto a Miguel Ángel, otros adjuntos usaron magistralmente sus conocimientos esforzándose para intentar que aprendiera todo lo que ellos saben. Muchos de los conocimientos que vienen a mi mente suenan con la voz afable y alegre de Antonio Garrido, el formador por excelencia de los residentes en nuestras temidas alarmas de trasplante. Paco Ruiz-Cabello y Pilar Jiménez

fueron dos apoyos imprescindibles, enseñándome mucho más que inmunología cuando he tenido la suerte de estar bajo su tutela. Laura Jáimez es la figura maternal por excelencia para los residentes que pasamos por autoinmunidad, además de una gran docente. Además, hubo otros que me enseñaron durante menos tiempo pero con no menos empeño como Marga, Susana, Quico, Matías y Teresilla, por mencionar solo unos pocos.

Y además de los maestros en los diferentes campos, estuvieron los muchos técnicos de laboratorio que me enseñaron los detalles de las diversas técnicas. Algunas fueron también buenas amigas fuera del hospital, como Pilar, Eva o la ya mencionada Toñi, y el resto fueron también personajes inolvidables, especialmente quienes estuvieron conmigo en las noches en vela de las guardias de trasplante: Toñi Martín, Pilar, Inma, Ángela, Teresa y Antonio.

Fueron también mi familia los demás residentes de inmunología: Antes que Alba estuvieron Mónica y Fernando marcándonos el camino; y aumentando la familia detrás de mí vinieron Nerea, Antonio y Paola, además del fantástico grupo que les siguió. Todos ellos son ya parte de mí y espero que nos encontremos en el futuro como inmunólogos profesionales.

Mi vida en Granada durante este periodo fue más llevadera también gracias a la gente que conocí ahí. Además de la gente ya mencionada, amigas como Ana, Dora y Claudia hicieron que las calles de Granada fueran para mí un entorno tan hogareño como mi Jaén natal.

En el máster de inmunología coincidí también con profesores que calaron hondo en mí y en mi nueva familia de compañeros y compañeras, con quienes viví la vida de estudiante que no aproveché para experimentar durante la carrera mientras avanzaba paso a paso por el camino de la investigación. De entre estos queridos nombres mencionaré a los otros dos pupilos de Miguel Ángel (Huo y Xu, también conocidos como Alfonso y Andrés) y a la gente con la que conservé más el contacto después, como Narella, Estefanía o Raquel; pero podría estar un buen rato recordando a este fantástico grupo de compañeros uno por uno y a nuestras veladas preguntándonos por qué siempre acabábamos tapeando en el mismo bar cuyas tapas no gustaban a nadie.

Y, por supuesto, en Jaén también tuve todo el apoyo que podía esperarse o quererse. Desde amigos de toda la vida como Víctor, David, Álex, Paty, Ana o Bea (más una hermana que una amiga) hasta gente que conocí estando ya en Granada como Andrés, Hugo, Charry o Ramón, o mis compañeros de andanzas cinematográficas y teatrales como mis grandes amigos Luisje y Carlos.

También cuento como amigos a mis compañeros de los Cines La Loma, especialmente al jefe, Dani, que nunca dudó en hacerme un hueco cuando he necesitado un trabajo; y por supuesto sin olvidar a mis compañeros de viajes y aventuras imaginarias de la asociación Oborus y su círculo de amigos y contactos, que ayudaron a que mi mente tuviera una vía de escape cuando más lo necesitaba.

Dejo para el final a mi familia en el sentido más literal. He tenido la suerte de haber crecido muy unido tanto a mi numerosa familia paterna como a la materna, de modo que cuento con una gran cantidad de primos, primas, tíos y tías con quienes puedo contar sin pensármelo dos veces. De entre ellos echo en falta que mi madrina, mi tía Pepi, hubiera podido llegar a ver esta tesis terminada. De mis abuelos, también me faltan mis abuelos paternos, Cristóbal y Ana, y mi abuelo materno, Pepe; que espero que puedan de alguna manera contemplar junto a ella este trabajo. Hay también familiares que, según la sangre, serían más distantes, pero que siempre sentí como cercanos como mi “tercera abuela” (mi difunta tía abuela materna Carmen) y su familia, especialmente sus hijas Nines y Ana, que prácticamente me criaron.

Llego ya al núcleo central de mi familia. Mis padres, Juan y Angelita, a quienes les debo literalmente todo y para los que cualquier agradecimiento quedaría corto; mi abuela Dulce, que aguanta a sus más de noventa años con una tenacidad envidiable; mi hermano Juan Alberto, con quien pasé de tirarnos de todo a la cabeza a ser al fin grandes amigos; mi cuñada Sara, que no por haber llegado después es menos parte de la familia, y mi sobrino Diego, a quien debo dolores de espalda y de cabeza que no cambiaría por nada. Y no puedo dejar de mencionar el hueco dejado por mi perrita Libby, a la que todos echamos de menos.

A todos los mencionados debo el haber llegado hasta aquí siendo la persona que soy. Cada punto y cada coma de esta tesis es un tributo a este elenco incomparable, y estoy seguro de que me dejo sin mencionar a mucha gente que debería estar en esta lista; además de gente a la que he mencionado de pasada o incluido en grupos sin mencionar sus nombres. A cada quien le doy las gracias

ÍNDICE

Contenidos

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	7
INTRODUCCIÓN	11
1 Clínica de la alopecia areata	13
1.1 Historia de la alopecia areata	13
1.2 Epidemiología	15
1.3 Manifestaciones clínicas	15
1.4 Diagnóstico	17
1.5 Tratamiento	19
2 Biología del folículo piloso	21
2.1 Diferenciación	21
2.2 Ciclo capilar	22
2.3 Estructura del folículo piloso	24
2.4 Conexión entre la piel y el sistema nervioso central	24
3 Sistema inmunitario cutáneo	26
4 Privilegio inmunológico y patogenia de alopecia areata	31
4.1 Privilegio inmunológico	31
4.2 Patogenia de la alopecia areata	31
5 El Complejo Mayor de Histocompatibilidad en humanos	33
6 Receptores de los linfocitos NK	39
7 Estructura de MICA	44
8 Genética de la alopecia areata	45
8.1 Relación de MICA con alopecia areata	45
8.2 MICA en otras enfermedades	46

8.3 Relación de HLA de clase I y alopecia areata	47
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	49
Hipótesis	51
Objetivos	51
MATERIAL Y MÉTODOS	53
1 Pacientes	55
2 Extracción de ADN y cuantificación.....	56
3 Estudio de microsátélites de MICA.....	57
3.1 PCR.....	57
3.2 Análisis de Fragmentos	58
4 Tipaje de HLA.....	59
4.1 PCR.....	59
4.2 SSO.....	60
5 Análisis estadístico.....	61
5.1 Descripción de la cohorte	61
5.2 Estudio caso-control	61
5.3 Equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW)	62
5.4 Desequilibrio de ligamiento.....	63
5.5 Corrección de Bonferroni.....	64
5.6 Paquetes estadísticos utilizados.....	65
RESULTADOS	67
1 Asociación de alopecia areata y <i>MICA</i>	69
1.1 Alelos de <i>MICA</i> y alopecia areata.....	69
1.2 Genotipos de <i>MICA</i> y alopecia areata	69
2 Ligamiento de <i>HLA-B</i> con <i>MICA</i> y alopecia areata	70
2.1 <i>HLA-B</i> y alopecia areata.....	70
2.2 <i>HLA-B</i> y <i>MICA</i>	71

DISCUSIÓN.....	77
1 Relaciones halladas de <i>MICA</i> con alopecia areata	79
1.1 <i>MICA</i> *A9.....	79
1.2 <i>MICA</i> *A6.....	80
2 Relaciones de <i>HLA-B</i> con alopecia areata.....	82
2.1 <i>HLA-B14</i>	82
2.2 <i>HLA-B38, B45 y B58</i>	83
3 Comparación entre estudios	83
CONCLUSIONES	85
BIBLIOGRAFÍA.....	89
ANEXO	101

ABREVIATURAS

AA: Alopecia areata.

AAA: Alopecia areata autoinmune.

ABP: Proteína ligadora de ATP (del inglés *ATP binding protein*).

ACOXL: Proteína de tipo acil-coenzima A oxidasa (del inglés *Acyl-coenzyme A oxydase-like protein*).

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

APC: Célula presentadora de antígeno (del inglés *Antigen presenting cell*).

BC2L11: Bcl2-like11.

CGRP: Péptido relacionado con el gen de la calcitonina (del inglés *Calcitonin gene related peptide*).

CLIP: Cadena peptídica invariante asociada a clase II (del inglés *Class II-associated invariant chain peptide*).

CRH: Hormona liberadora de corticotropina (del inglés *Corticotropin-releasing hormone*).

DM: Diabetes mellitus.

ERAAP: Aminopeptidasa del retículo endoplasmático asociada al procesamiento de antígeno (del inglés *Endoplasmic reticulum aminopeptidase associated with antigen processing*).

GARP: Repeticiones de glicoproteína-A predominantes (del inglés *Glycoprotein-A repetitions predominant*).

GWAS: Estudio de asociación de genoma completo (del inglés *genome-wide association study*)

HLA: Antígeno leucocitario humano (del inglés *Human leucocyte antigen*).

IL: Interleucina.

ILC: Célula linfoide innata (del inglés *Innate lymphoid cell*).

IFN: Interferón.

iSALT: Tejido linfoide asociado a la piel inducible (del inglés *inducible skin-associated lymphoid tissue*).

JAK: Janus kinasa o Janus quinasa.

KIR: Receptor tipo inmunoglobulina de células NK (del inglés *Killer cell immunoglobulin-like receptor*).

KLR: Receptor de tipo lectina de los linfocitos NK (del inglés *Killer cell lectin-like receptor*).

MALT: Tejido linfoide asociado a mucosa (del inglés *Mucose-associated lymphoid tissue*).

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad (del inglés *Major histocompatibility complex*).

MICA: Tipo MHC de clase I A (del inglés *MHC Class I-like A*).

NCR: Receptor de citotoxicidad natural (del inglés *Natural cytotoxicity receptor*).

NGF: Factor de crecimiento nervioso (del inglés *Neural growth factor*).

NK: Asesina natural (del inglés *Natural killer*).

NKG2D: Receptor de Asesina natural (*Natural Killer*) de grupo 2D.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés *polymerase chain reaction*).

RE: Retículo endoplasmático.

SALT: Tejido linfoide asociado a la piel (del inglés *Skin-associated lymphoid tissue*).

SH2B3: Proteína 3 adaptadora SH2B.

SNP: Polimorfismo de un solo nucleótido (del inglés *Single nucleotide polymorphism*).

STAT: Transductor de señales y activador de la transcripción (del inglés *Signal transducer and activator of transcription*).

STR: Repetición corta en tándem (del inglés *Short tandem repeat*).

TAP (1 y 2): Transportador asociado al procesamiento de antígeno (del inglés *Transporter associated with antigen processing*).

TCR: Receptor de célula T (del inglés *T cell receptor*).

TLR: Receptor de tipo Toll (del inglés *Toll-like receptor*).

TNF: Factor de necrosis tumoral (del inglés *Tumoral necrotic factor*).

TRH: Hormona liberadora de tirotrópina (del inglés *Thyrotropin-releasing hormone*).

TSH: Tirotrópina, hormona estimulante del tiroides (del inglés *Thyroid-stymulating hormone*).

ULBP: *UL16 binding protein*, ligando de NKG2D.

RESUMEN

Alopecia areata es una enfermedad consistente en una caída del cabello en zonas discretas del cuero cabelludo; que a veces se extiende por todo este o incluso por todo el cuerpo. Se ha descrito una relación de esta enfermedad tanto con el estrés como con el sistema inmunitario, considerándose una enfermedad autoinmune.

En esta dolencia, el ciclo capilar se interrumpe terminando prematuramente la fase anágena (de crecimiento) y entrando prematuramente en fase catágena (pausa del crecimiento). Esto se debe a una pérdida del privilegio inmune en los queratinocitos del folículo piloso, donde normalmente hay una expresión reducida de HLA mientras que en la alopecia areata se suele encontrar un infiltrado de células NK y un aumento de la expresión de la molécula señalizadora de estrés MICA.

Se ha establecido la relación genética entre algunas variantes de la molécula MICA y esta enfermedad; mediante un estudio de asociación de genoma completo o GWAS. Este estudio, sin embargo, solamente incluía mutaciones puntuales y no variaciones de longitud en fragmentos de repetición.

La molécula MICA incluye una secuencia de aminoácidos de longitud variable (por una repetición en tándem corta o STR en el gen) en su región transmembrana. Este estudio intenta determinar si dicho polimorfismo está relacionado con la susceptibilidad a alopecia areata en nuestra población de estudio, de pacientes del área de Granada.

Para empezar determinamos, mediante análisis de fragmentos de longitud variable, el alelo del gen *MICA* en pacientes y controles respecto a su STR. Junto a esta determinación, realizamos un tipaje de l gen *HLA-B* mediante la técnica SSO (oligonucleótidos de cadena simple), ya que ambos genes están estrechamente ligados y se han descrito múltiples interacciones de *HLA-B* con alopecia areata.

El enfoque del estudio consistió en buscar relación de los alelos individuales de *MICA* con la enfermedad y de los distintos genotipos *MICA*, así como de los alelos de *HLA-B* presentes. También se realizó un estudio de ligamiento entre cada alelo *MICA* con cada alelo *HLA-B* presentes en nuestros pacientes.

Nuestro principal hallazgo es una función protectora del alelo *MICA**A9 frente a alopecia areata. Esto no se correspondió con ninguna relación entre genotipos *MICA* y la enfermedad. Por otro lado, no se halló relación de *MICA**A6 con alopecia areata, descrita previamente.

De entre los alelos de *HLA-B*, solo *HLA-B14* se mostró como un factor de riesgo para la aparición de alopecia areata; relación nunca descrita antes, por otro lado. Ningún alelo en desequilibrio de ligamiento con *MICA**A9 mostró relación con la enfermedad. Este alelo se ha mostrado relacionado (a veces como factor de riesgo y otras como factor de protección) con otras enfermedades relacionadas con el sistema inmunitario y con el desarrollo de algunas neoplasias.

Hay que señalar que *HLA-B14* se halló muy cerca de mostrar un desequilibrio de ligamiento con *MICA**A6 (de hecho habría resultado altamente significativo de no haber aplicado la corrección de Bonferroni para las 100 comparaciones de 5 alelos *MICA* con 20 alelos *HLA-B*, lo que nos obliga a ser mucho más exigentes). Aunque este resultado no demuestra dicha relación, sí que ilustra los riesgos de no estudiar juntos estos genes, ya que de haber resultado significativo habría puesto en tela de juicio el resultado del estudio que describió la relación de *MICA**A6 con alopecia areata al poder explicarlo como una interferencia de la influencia de *HLA-B14* y su desequilibrio de ligamiento con el alelo *MICA* en cuestión.

INTRODUCCIÓN

1 Clínica de la alopecia areata

1.1 Historia de la alopecia areata

La alopecia areata se conoce desde la antigüedad [4]. Esta enfermedad fue descrita por primera vez por Cornelio Celso en el año 30 después de Cristo. Junto a la alopecia total, que decía que causaba calvicie completa a pacientes de cualquier edad, describió la “ofiasis” (“serpiente”), en la que la región alopécica “serpenteaba” por el cuero cabelludo de los pacientes (solamente niños, según él). Esta enfermedad ha sido conocida por muchos nombres a lo largo de la historia, entre ellos “area celsi” en honor a Celso, hasta que se usó por primera vez el término “alopecia areata” en la *Nosologica Medica* de Sauvages [5].

La causa de la alopecia areata se lleva debatiendo desde principios del siglo XIX. A mediados del siglo XX surgieron dos hipótesis principales: la infección parasitaria [6] y el desorden nervioso [7].

El origen parasitario de la enfermedad parecía estar apoyado por la lenta manera de expansión de los parches alopécicos, parecida a la de una infección local; pero más aún por las aparentes epidemias de alopecia areata descritas en escuelas y orfanatos [8-10]. Sin embargo, no se consiguió aislar un microorganismo que la causara en ninguno de los intentos realizados por Sabouraud [11], Ormsby [12] o Ikeda [13].

La hipótesis trofoneurótica, neurotrófica o neuropática, por otro lado, pronto se convirtió en la más popular entre la comunidad científica, siendo defendida todavía por muchos dermatólogos, ya que es difícil probar la realidad o no de dicha hipótesis. Su principal respaldo son los episodios de estrés asociado con su aparición, incluyendo el estrés físico y los traumas descritos por Kingsbury [14] y Sequeira [15], y también se supuso que influía el estrés emocional. En 1886, Joseph intentó demostrarlo cortando terminaciones



Figura 1: Cornelio Celso. Retrato de Pierre Roch Vignerón

nerviosas en la piel de gatos, induciendo así parches sin pelo y atrayendo un gran respaldo a esta hipótesis, aunque luego se sugirió que la pérdida de pelo se debía a que los gatos se rascaban más en esas zonas [16].

En 1902, Jacquet sugirió que las infecciones y los defectos dentales irritaban los nervios originando alopecia areata [17]. Ésto fue aparentemente confirmado en 1909 por Decelle [18], aunque un año más tarde Baily mostró que las enfermedades dentales tenían la misma frecuencia en pacientes de alopecia areata que en la población sana [19]. En 1939, Kinnear relacionó de la misma manera el cansancio ocular con esta enfermedad [20].

Cuando, en 1913, Sabouraud mostró la asociación de alopecia areata con desórdenes de glándulas endocrinas (principalmente el tiroides) [21], se empezó a postular una disfunción hormonal como posible causa, siendo esta hipótesis la nueva rival de la trofoneurótica.

Los pacientes de alopecia areata estaban sometidos a la presión social de una enfermedad que, a primera vista, se podía confundir con tiña o sífilis, que hasta la llegada de los antibióticos era una enfermedad muy contagiosa y extendida y, en sus primeras manifestaciones, se muestra muy similar a la alopecia areata, como describieron Ormsby [12] y Roxburgh [22]. Éste último también describió afectación ungueal en el caso de la sífilis. Savill había descrito, además, cómo esta enfermedad causaba alopecia areata por el estrés provocado y su posible efecto sobre el sistema endocrino [23], lo que contribuyó al estigma social de los pacientes de esta alopecia denunciado por Ormsby.

En 1912, Adamson atribuyó la alopecia areata a un tóxico desconocido [24], lo que dio pie a una nueva hipótesis sobre el origen de la enfermedad, apoyada por los casos de remisión y recaída y su patrón de aparición por el cuerpo simultáneamente. Mostró que el veneno para ratas (acetato tálico) provocaba en éstas una pérdida de pelo similar a la alopecia areata, hasta el punto de mostrar pelos en signo de admiración (un criterio de diagnóstico de ésta). Esta hipótesis fue respaldada por Dixon en 1927 [25], Ormsby en 1948 [12] y Roxburgh en 1950 [22] (este último fue el que describió los pelos en

signo de admiración en las ratas); pero nunca recibió mucho apoyo y hace tiempo que no es respaldada por la comunidad científica.

En la actualidad se cree que el origen de la alopecia areata es autoinmunitario. Aunque el hallazgo de células inflamatorias se remonta a 1891 (por parte de Giovannini) [26], hasta 1958 no propuso Rothman esta hipótesis por primera vez, en la discusión de un artículo de Van Scott [27]. Desde entonces, la evidencia a su favor se va acumulando cada vez más; aunque, en vez de hallarse autoanticuerpos, todo apunta a la pérdida del inmunoprivilegio del folículo [28], y esta tesis se centra en el estudio de la respuesta inmunitaria en el folículo piloso durante esta enfermedad.

1.2 Epidemiología

Esta enfermedad afecta a pacientes de todos los grupos de edad, aunque principalmente aparece antes de los 30 años [29]. La distribución entre géneros es igual, y también afecta a distintas etnias [30]. La prevalencia total es de aproximadamente 1/1000, con un riesgo a lo largo de toda la vida del 2% [30].

Los desencadenantes asociados a esta enfermedad son muy variados, como se vio antes. El estrés psicológico (tanto a largo plazo como tras un shock repentino) [31], trauma físico (a veces lesiones en la piel, pero también se ha asociado a golpes en la cabeza) [4], infección viral o bacteriana [32], exposición a productos químicos o tratamientos biológicos [33, 34], alergias [35], predisposición genética [36, 37], hormonas del embarazo (se ha descrito el inicio de la enfermedad o recuperación temporal al final del embarazo, con cambios similares también en la pubertad y la menopausia) [38] o incluso cambios estacionales (caída del pelo más intensa en invierno y leve recuperación en verano) [39].

1.3 Manifestaciones clínicas

Las lesiones características de esta enfermedad son zonas alopécicas circulares y lisas, bien delimitadas salvo en la variante difusa, y a veces enrojecidas. En algunos casos se produce una fusión de estas zonas a lo largo de la zona occipital, lo que se conoce como ofiasis [40]. Cuando se produce el

patrón inverso, en el área frontal, recibe el nombre de “sisaifo” (“ofiasis” invertido) [41]. En algunas ocasiones se presentan fuera del cuero cabelludo, aunque no es lo normal [42]. Se pueden ver ejemplos de estos patrones en la Figura 2.



Figura 2: Manifestaciones de alopecia areata. Parche en el cuero cabelludo (A), alopecia difusa (B), ofiasis (C) y parche en la barba (D). Fuente: Uptodate.

La variante difusa aguda y total tiene un pronóstico más favorable [43].

Algunas veces, la pérdida de cabello viene precedida por un picor o una quemazón. Las canas son más resistentes y a menudo el paciente ofrece un aspecto canoso en la zona afectada, por la caída en primer lugar del pelo pigmentado y la recuperación en primer lugar de las canas. En los casos más graves, puede haber incluso una afectación de las uñas en forma de onicorrexia, traquioniquia, onicolisis, onicomadesis o moteado rojizo de las lúnulas [44] como se aprecia en la Figura 3.

Además de los síntomas propios de la enfermedad, la alopecia areata se asocia a otras enfermedades autoinmunitarias, como desórdenes oculares (opacidades punteadas o cataratas tempranas), tiroiditis autoinmune en un 8-28% de los casos o vitíligo en un 3-8%. Por otro lado, desórdenes atópicos

(como la dermatitis atópica, asma o fiebre del heno) han mostrado predisposición a sufrir alopecia areata [45].

Aparte de las enfermedades asociadas en pacientes, se da el curioso caso de la diabetes mellitus tipo I, que es más frecuente en familiares de afectados, pero no en éstos. Mientras que en la población general la frecuencia de la DM tipo I es de 0,12 a 0,25%, en hermanos de probandos llega a ser de 1,2%. En probandos, por otra parte, se da en un 0,2% de los casos, lo que está dentro del margen normal. Esto parece indicar no sólo una asociación genética entre ambas enfermedades, sino también una función protectora de la alopecia areata contra la DM tipo I [46].

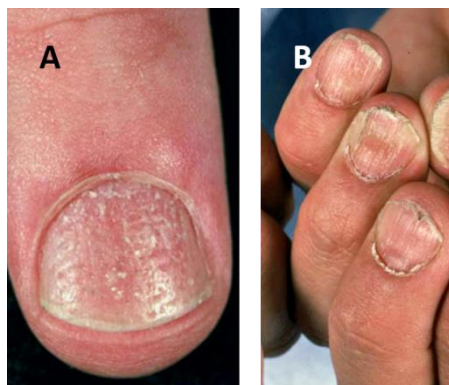


Figura 3: Afectación ungueal. Huecos en la uña (A) y traquioniquia, con crestas longitudinales en las uñas (B). Fuente: Uptodate.

Además, los efectos de la pérdida de cabello pueden ocasionar a los pacientes ansiedad y desórdenes emocionales por su efecto en la apariencia y el estrés causado en consecuencia [47].

El transcurso de la enfermedad puede llevar a la recuperación espontánea en un año en un 50% de las ocasiones, aunque suele haber varios episodios posteriores [48]. En el polo opuesto está el 10% de los casos que evolucionan a alopecia totalis, con pérdida de todo el cabello; o incluso alopecia universalis, con pérdida de todo el vello corporal [49].

Las principales influencias que empeoran el pronóstico son la gravedad (totalis y universalis sobre todo), aparición durante la infancia, ofiasis, duración superior a un año, afectación de las uñas, enfermedad atópica e historia familiar de alopecia areata [48].

1.4 Diagnóstico

La principal característica de esta enfermedad son las áreas alopécicas lisas, sin más cambios que un ligero enrojecimiento que aparece en algunos casos. En los bordes se hallan pelos en “signo de exclamación”, partidos cerca

de la base, fáciles de extraer con fuerza mínima y con mayor anchura en el extremo distal que en el proximal, como se ve en la Figura 4 [30].

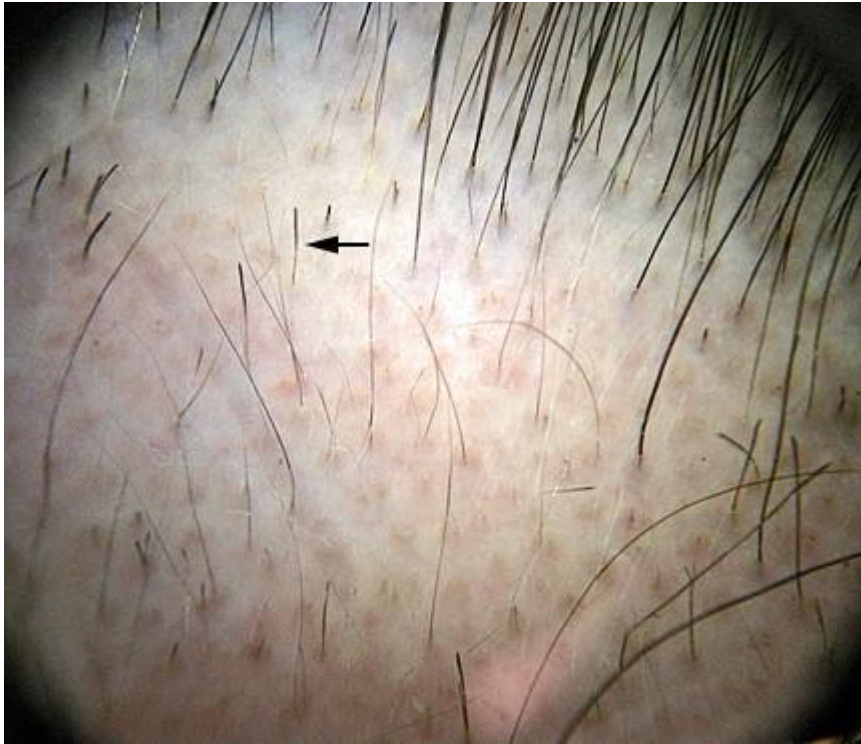


Figura 4: Pelos en signo de exclamación (uno indicado por la flecha). Fuente: Uptodaten cuarto

La dermoscopia no da resultados específicos en este caso, aunque sí útiles [50], y en los casos de diagnóstico incierto (como a la hora de diferenciar la enfermedad en su variante difusa del efluvio telógeno), se realiza una biopsia en la que se halla un infiltrado de linfocitos en colmena de abejas alrededor de los folículos anagénicos. Además, puede hallarse un edema folicular, una necrosis celular, microvesiculación o incontinencia pigmentaria. Se ha sugerido la búsqueda de anticuerpos específicos contra el folículo piloso, pero aún no están disponibles en los laboratorios clínicos [51].

Hay ciertas enfermedades que se pueden confundir con la alopecia areata a simple vista, reflejadas en la Figura 5. En el caso de la tiña, por ejemplo, el diagnóstico diferencial se basa en el aspecto de esta última, que da un parche escamoso con puntos negros en la apertura de los folículos, unos parches muy diferentes a los de alopecia areata [30].

La tricotilomanía (la extracción nerviosa del propio cabello a tirones) muestra los cabellos rotos a diferente longitud, sin áreas totalmente alopécicas.

Las alopecias cicatriciales como el lupus eritematoso discoide destruyen los folículos y dejan una cicatriz en la cual la alopecia es irreversible con los métodos actuales [30].

La alopecia androgénica, por otra parte, tiene un patrón característico y gradual, sin pelos en signo de exclamación. El avance desde la coronilla y el área frontoparietal es muy diferente a los parches circulares producidos por la alopecia areata. También la sífilis secundaria muestra un patrón distinto, como apolillado, aunque pueden necesitarse pruebas serológicas para confirmar este diagnóstico. Por último, la alopecia triangular temporal muestra parches triangulares (uni o bilaterales) en las sienes con vello disperso, que aparecen en la infancia y duran de por vida [30].



Figura 5: Diferentes tipos de alopecia. Tiña, con su aspecto escamoso (A), tricotilomanía, con sus restos de pelo arrancado (B), lupus discoide, con el tejido cicatricial (C), alopecia androgénica con su patrón característico (D), sífilis secundaria, con su contorno irregular (E) y alopecia triangular temporal, con su localización característica (F). Fuente: Uptodate.

1.5 Tratamiento

Las terapias de primera línea incluyen normalmente corticoesteroides tópicos o, en adultos que lo toleren, en inyecciones intralesionales; aunque pueden darse efectos secundarios como telangiectasias, atrofia local de la piel, hipopigmentación y supresión adrenal [52].

Cuando la pérdida es superior al 50% del cuero cabelludo, se aplica una inmunoterapia tópica, con un alérgeno de contacto ponente para provocar irritación y crecimiento capilar. Esto puede causar una dermatitis grave, linfadenopatía, urticaria, vitíligo o discromía, y no se recomienda en embarazadas [52].

Las terapias de segunda línea se usan junto a las de primera línea. El minoxidil no tiene efecto ante una pérdida total del cabello y se requiere su aplicación continua para mantener el crecimiento, aparte de tener efectos secundarios como el crecimiento de vello facial en un 3% de las mujeres a las que se aplica, prurito o dermatitis. Estos últimos aparecen con menos frecuencia con espumas, ya que no llevan propilenglicol [52].

En el caso de la antralina, se usan dosis en aumento y puede causar una irritación leve con eritema y escamación, que no debe llegar a ser grave ni vesicular. Tanto ésta como el minoxidil tienen el defecto de una efectividad baja [52].

La fotoquimioterapia de rayos UVA y psoraleno (PUVA) es más efectiva y su uso es razonable en pérdidas de al menos un 75% del cabello. Algunos estudios incluso indican que es efectivo contra recaídas frecuentes, pero sus efectos adversos incluyen neoplasias de piel si se usa a largo plazo [53].

En casos graves se usan a veces terapias sistémicas. La sulfasalazina [54], metotrexato [55] y ciclosporina [56] se usan con este fin, pero principalmente los glucocorticoides orales. Estos parecen estimular el crecimiento capilar, aunque su tratamiento está limitado en duración por los efectos secundarios y al retirarse hay una pérdida de pelo recurrente [57].

Otras terapias usadas son el láser de excímeros (solo en la variante parcheada del cuero cabelludo) [58], el bexaroteno tópico [59], el plasma rico en plaquetas [60] y la hidroxiclороquina (con resultados poco fiables) [61].

Los inhibidores de Janus quinasas como tofacitinib [62] o ruxolitinib [63] son la terapia más prometedora actualmente, aunque siguen en estudio.

2 Biología del folículo piloso

2.1 Diferenciación

La diferenciación del folículo piloso fue descrita en 1992 por Hardy [64], y sus bases moleculares por Schmidt y Ullrich en 2005 [65]. Se trata de un proceso muy preciso de organogénesis y diferenciación celular. En su modelo, la dermis transmite una primera señal a la epidermis para el desarrollo de un apéndice inespecífico, formándose un engrosamiento de esta llamado placoda. Esta, a su vez, señala a la dermis para que prolifere, formando la papila dérmica.

La papila, según el modelo de Hardy, envía una señal específica al acúmulo de células epidérmicas, que forman un tubo (la espiga) cuyo extremo comienza a rodearla, y hace que se dividan a mayor velocidad. Las células hijas se desplazan por el folículo en formación para dar los distintos tipos de células, según su localización: bien células capilares o de la vaina de la raíz [66]; aunque se ha visto que los linajes no están determinados de manera

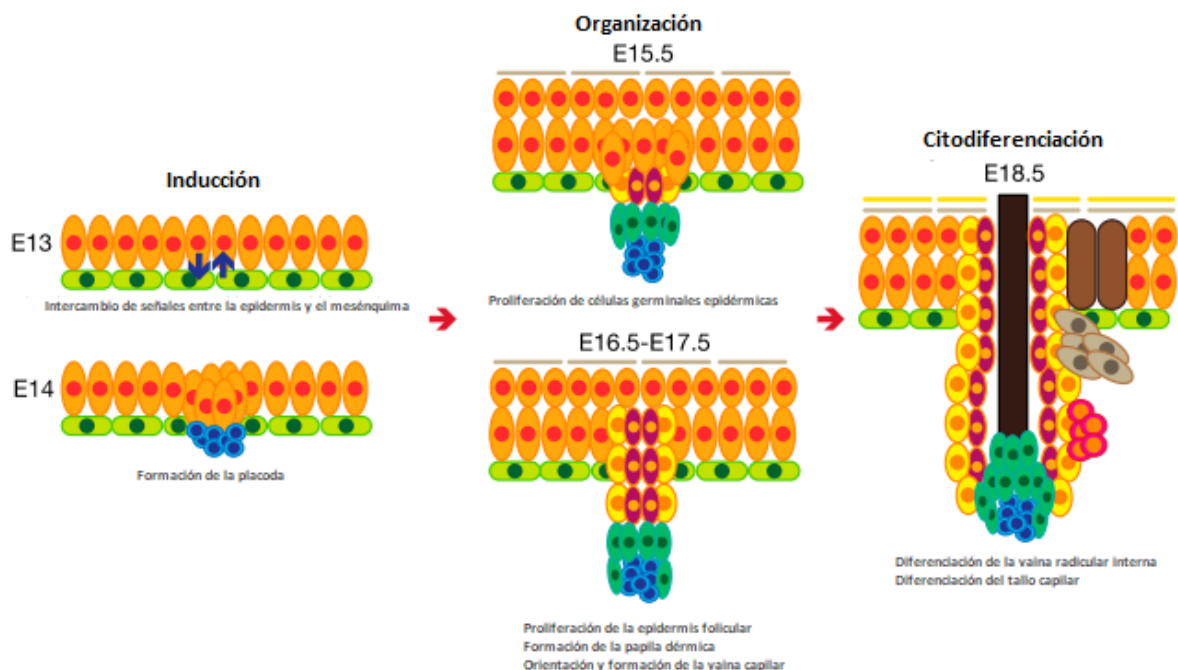


Figura 6: Diferenciación del folículo piloso. Durante la inducción se forma un gradiente de activadores e inhibidores (E13) que induce la diferenciación de la placoda y la papila dérmica (E14). Esta señala para inducir la diferenciación del folículo (E15.5 a E17.5). En la fase de citodiferenciación se diferencian la vaina interna y la externa, forman el tallo capilar, se reclutan melanocitos y células hematopoyéticas y se forman las cúpulas táctiles y glándulas sebáceas. Imagen modificada de Abe et al [3].

absoluta y que al cambiar de posición variaría el tipo celular que daría una célula progenitora [67].

Se ha determinado que esta señal está mediada por la secreción de WNT, que se transmite intracelularmente por el segundo mensajero β -catenina [66]. WNT es crucial en la diferenciación de la piel, desde la estratificación de la epidermis hasta la formación del folículo piloso. Es el aumento de su concentración en la zona de la placoda la señal que produce la papila dérmica. SHH también es crucial en el desarrollo, tanto en la proliferación como en la diferenciación de las células del folículo [3]. Aunque no es necesario para iniciar la diferenciación (hay folículos presentes en su ausencia), WNT5a (cuya producción es estimulada por SHH) desempeña un papel importante en la activación de la papila dérmica, que pierde poder inductor en su ausencia.

SHH es también necesario para la diferenciación de los tejidos adyacentes, formando las glándulas sebáceas y la acumulación de células de Merkel que forman los domos táctiles [3].

2.2 Ciclo capilar

Cada folículo ya formado sigue un ciclo de crecimiento establecido, en el que su porción más superficial permanece constante, mientras que la basal sufre cambios periódicos [68]. La fase en la que se encuentra cada folículo es independiente de los demás, habiendo en la misma superficie una proporción variable de pelo en diferentes etapas de crecimiento (Figura 7).

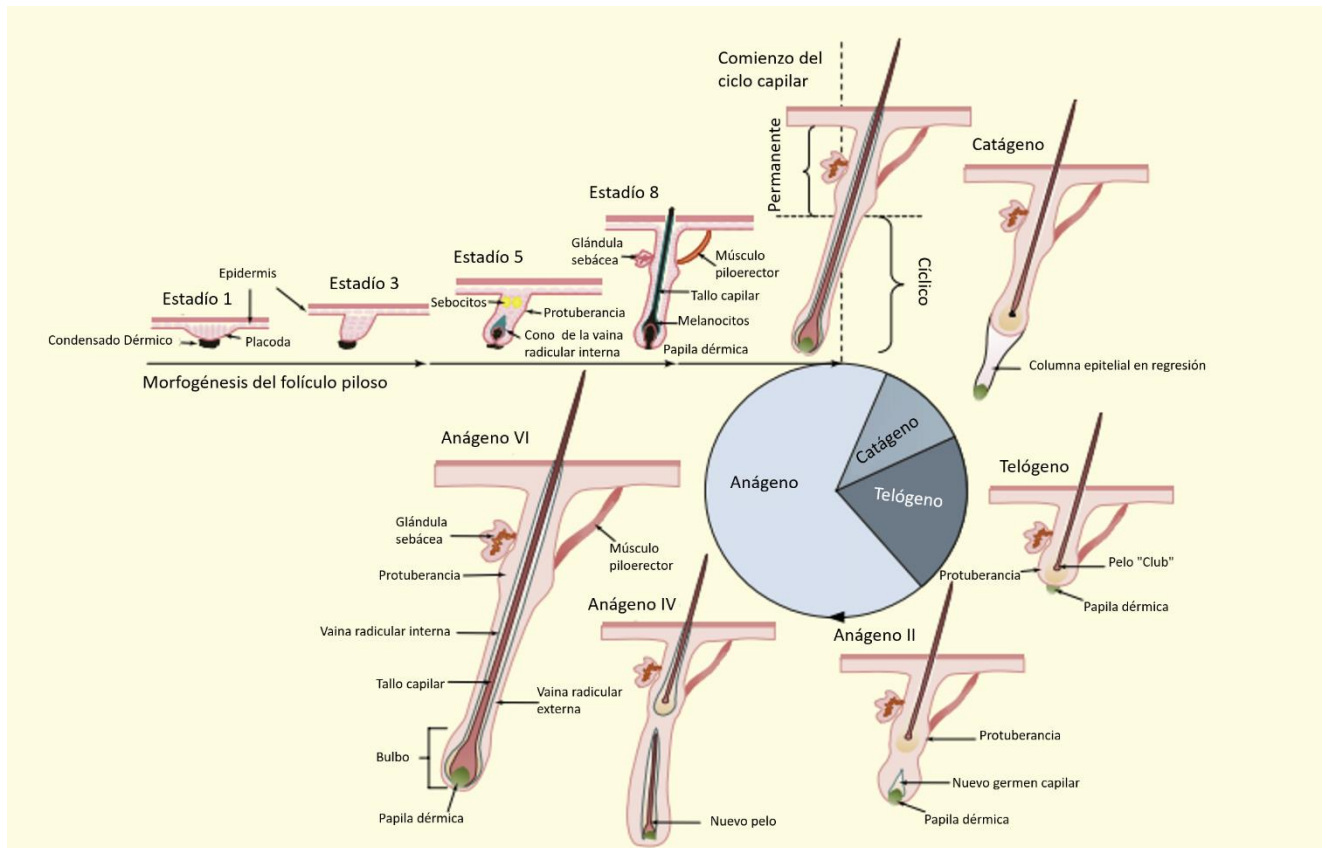


Figura 7: El ciclo capilar. La morfogénesis capilar postnatal produce la elongación del folículo y la producción de la fibra capilar. Esta crece hacia el exterior y comienza el ciclo capilar desde una primera fase catágena en la que el pelo sufre regresión. La cercanía de la papila dérmica y la protuberancia durante la fase telógena es crucial para la regeneración del folículo, ya que es aquí donde residen las células madre foliculares. Imagen modificada de Schneider et al [69].

La fase de crecimiento capilar es llamada fase anágena, y en humanos su duración depende de la superficie, pero en el cuero cabelludo dura de 1 a 8 años. La raíz del cabello rodea la papila dérmica, que estimula la división celular y el crecimiento en este.

La fase anágena va seguida por una fase corta de regresión llamada fase catágena, en la que la base del folículo sufre procesos de apoptosis y degenera durante unas semanas hasta que prácticamente desaparece el bulbo y el pelo es empujado parcialmente hacia el extremo externo.

Por último, el folículo permanece unos meses (de nuevo, el tiempo concreto varía según la superficie) en fase telógena o de reposo, durante la cual el pelo tiene la morfología conocida como “pelo club”, con la base redondeada. En la fase telógena, el pelo cae, para luego comenzar una nueva fase anágena.

Durante la fase telógena hay una estructura transitoria llamada germen capilar secundario, sobre la papila dérmica [68]. Esta es el blanco de las señales que inician la fase anágena, y le da inicio proliferando para dar origen a la raíz del nuevo cabello, que sustituye al antiguo, al que expulsa.

2.3 Estructura del folículo piloso

El folículo piloso es un tubo que se extiende desde la superficie externa desde la epidermis hasta la dermis. En el extremo están el infundíbulo o apertura y el istmo. Estos conforman la porción constante, no sujeta a los cambios del ciclo capilar. En el istmo hay un engrosamiento llamado protuberancia, donde se ancla el músculo piloerector. Por encima de este desemboca la glándula sebácea [69].

En la base está la porción cíclica. La papila dérmica se encuentra en el extremo basal, envuelta por el bulbo (el extremo basal, más engrosado, del pelo), y entre ambos están las células proliferativas de la matriz, procedentes de queratinocitos y que desaparecen por apoptosis en la fase catágena. El pelo está envuelto por la vaina radicular, que forma dos capas: la externa y la interna (esta última, procedente de la matriz). Envolviendo a la vaina radicular externa hay una vaina de tejido conectivo (Figura 7).

La vaina radicular interna, por otra parte, se divide en varias capas: Las más cercanas a la vaina externa son las células acompañantes. Unidas estrechamente a estas están las células de la capa de Henle; a continuación está la capa de Huxley y, por último, en contacto con el pelo, la cutícula de la vaina radicular interna.

El pelo en sí también está formado por capas: La médula en el centro, rodeada por la corteza y esta, a su vez, rodeada por la cutícula capilar, que es la que está en contacto con la vaina radicular.

2.4 Conexión entre la piel y el sistema nervioso central

La alopecia areata es solo uno de los ejemplos en los que mejor se puede apreciar la influencia que el sistema nervioso puede tener sobre la piel, estando clara la relación entre el estrés emocional y esta enfermedad [29, 70].

Los folículos pilosos suelen ser los lugares donde más clara está esta interacción, y especialmente el efecto de “encanecimiento prematuro” [40, 71], en el que el pelo pigmentado se desprende y quedan las canas a la vista. Aunque este fenómeno se ha dado independientemente, también ocurre en la alopecia areata al caer primero el pelo pigmentado [40].

Un folículo piloso está innervado por terminaciones sensoriales, pero también recibe mediadores de estrés neuroendocrinos como la sustancia P, el factor de crecimiento nervioso (NGF) o la hormona liberadora de corticotropina (CRH) [72]. También reciben señales de prolactina, adenocorticotropina, el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) y el péptido vasoactivo intestinal, que regulan el prurito y la inflamación como respuesta al estrés por medio de los mastocitos [73].

Hay autores que hablan de un eje cerebro-entero-cutáneo [74]. De hecho, varias de estas moléculas (neurohormonas, neuropéptidos y neurotransmisores), normalmente asociadas con el sistema nervioso central, son sintetizadas por queratinocitos y sebocitos [75].

En la piel hay un equivalente al eje hipotálamo-hipofisario-adrenal, pero a diferencia de este no hay una diferenciación compartimentada que equivalga a las tres glándulas por separado, sino que todas (y sus receptores) se expresan en los queratinocitos de la vaina radicular externa [76]. La CRH promueve la degranulación de los mastocitos, lo que puede contribuir al proceso inflamatorio [77], y también está en una población de melanoblastos inactivos melanogénicamente, o incluso progenitores de melanocitos, en el extremo proximal del folículo piloso anágeno [78].

También se han descubierto hormonas del eje hipotálamo-hipofisario-tiroideo como hormona liberadora de tirotrópina (TRH) y la propia tirotrópina (TSH). Estas parecen ejercer control sobre el crecimiento, metabolismo energético y pigmentación del folículo. De hecho, TSH se expresa principalmente en los queratinocitos de la vaina radicular externa, donde influye sobre su metabolismo [79]. Curiosamente, los receptores de TRH parecen estar restringidos a la vaina radicular interna (una región que se creía sin relación directa con el crecimiento capilar), mientras que sus efectos se dejan

ver en la vaina externa y en la matriz: prolongación de la fase anágena, crecimiento del pelo y pigmentación [80]. Esto puede indicar un papel mediado por la vaina interna o la existencia de un receptor diferente en el tejido responsable de dichos efectos.

Caso aparte es la prolactina, que, mientras que en varones tiende a provocar la entrada en etapa catágena [81], cuando se estudió en mujeres se descubrió que lo que causa es una prolongación de la fase anágena [82].

En cuanto a la melatonina, se produce en los folículos pilosos en respuesta a la noradrenalina (que también induce su liberación en la hipófisis). Además, sus receptores se expresan de manera dependiente del ciclo capilar y, al ser estimulados, aumenta la expresión de los receptores de estrógenos [83]. Esto es muy indicativo del efecto que el estrés puede tener sobre el folículo piloso.

Resumiendo, el folículo piloso tiene en sus células receptores que pueden captar el estrés entre otros estímulos, y además puede señalar con moléculas normalmente asociadas al sistema nervioso para estimular a los mastocitos e iniciar una respuesta inflamatoria, siendo uno de los más probables orígenes de la alopecia areata.

3 Sistema inmunitario cutáneo

El folículo piloso es considerado un lugar inmunoprivilegiado. Esto significa que es capaz de tolerar antígenos sin provocar respuesta inflamatoria.

La piel, al igual que las mucosas, es un tejido que forma barrera con el medio externo; por lo tanto su sistema inmunitario funciona de manera diferente al de la sangre y otros tejidos estériles, en los que no es necesario mantener tolerancia frente a un microbioma normal. A diferencia de las mucosas, la epidermis forma una barrera mecánica que aísla a las células propias del contacto directo con dicho microbioma y otras fuentes de daño.

Se han identificado muchas poblaciones con función inmunitaria específica en la piel [84]. Los propios queratinocitos de la epidermis producen péptidos antimicrobianos como catelicidinas o β -defensinas, y también

interleucinas proinflamatorias como IL-1 o IL-18 mediante el inflamasoma [85], y otras como IL-6, IL-10 y TNF, además de quimiocinas como CXCL9, CXCL10, CXCL11 y CCL20, que atrae a la epidermis a los precursores de las células de Langerhans [86]. También atraen a los neutrófilos al producir CXCL1 y CXCL8 [87].

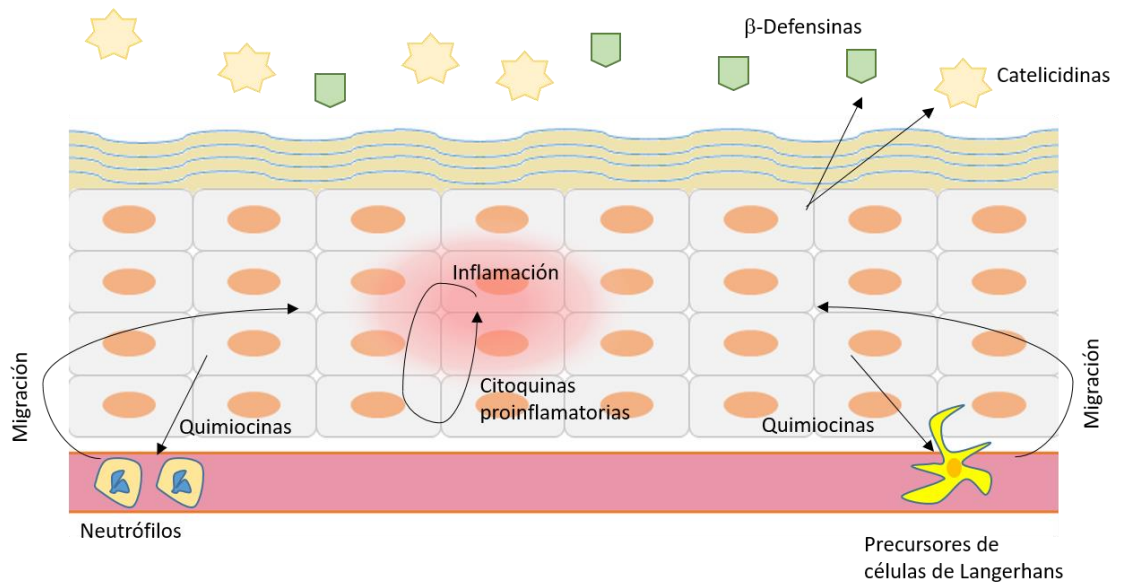


Figura 8: Secreción de sustancias de los queratinocitos y su efecto en el reclutamiento celular, inflamación y secreción de péptidos antimicrobianos.

Los queratinocitos promueven también respuestas inmunitarias de tipo 1 (contra parásitos intracelulares o virus) y producción de interferones mediante sus TLR [88]. En respuesta a interferón- γ , los queratinocitos pueden expresar MHC de clase II [89] y, aunque no pueden estimular a linfocitos T naïve, sí que pueden activar a los CD4 y CD8 maduros [90].

Las células de Langerhans de la epidermis, aunque similares a las células dendríticas de la dermis y otros tejidos, tienen una función principalmente tolerogénica [91] mediante la regulación negativa de la respuesta CD8⁺ y la activación de T_{reg} [92]. Las células de Langerhans, al activarse, extienden sus apéndices para capturar antígeno [93] y migran a las áreas pobladas por linfocitos T, siendo cruciales para la activación de linfocitos Th2 [94].

Las células dendríticas de la dermis son una población totalmente distinta, con distintas subpoblaciones y activadoras, al contrario que las células

de Langerhans. Unas son positivas para la integrina CD103 y la lectina langerina, que se creía exclusiva de las células de Langerhans, y están especializadas en la presentación cruzada [95]; otras son células dendríticas clásicas sin langerina, procedentes de distintos precursores [96].

En conjunto, las células dendríticas y las de Langerhans forman una doble capa que, en su lado exterior, mantiene a la flora bacteriana comensal superficial controlada y en el interior está preparada para actuar si algún microbio pasa a la zona que se espera que se mantenga estéril.

En la zona más exterior de la dermis están concentrados los mastocitos, que, además de su conocida actividad de defensa contra parásitos, desempeñan importantes labores en la curación del tejido y la inmunorregulación [97], con la producción de IL-10 de efecto inmunosupresor [98]. También pueden actuar como células presentadoras de antígeno profesionales expresando MHC de clases I y II y señales coestimuladoras y migrando a los ganglios [99]. Como se vio anteriormente, pueden ser los que inicien la respuesta inflamatoria como respuesta a señales nerviosas.

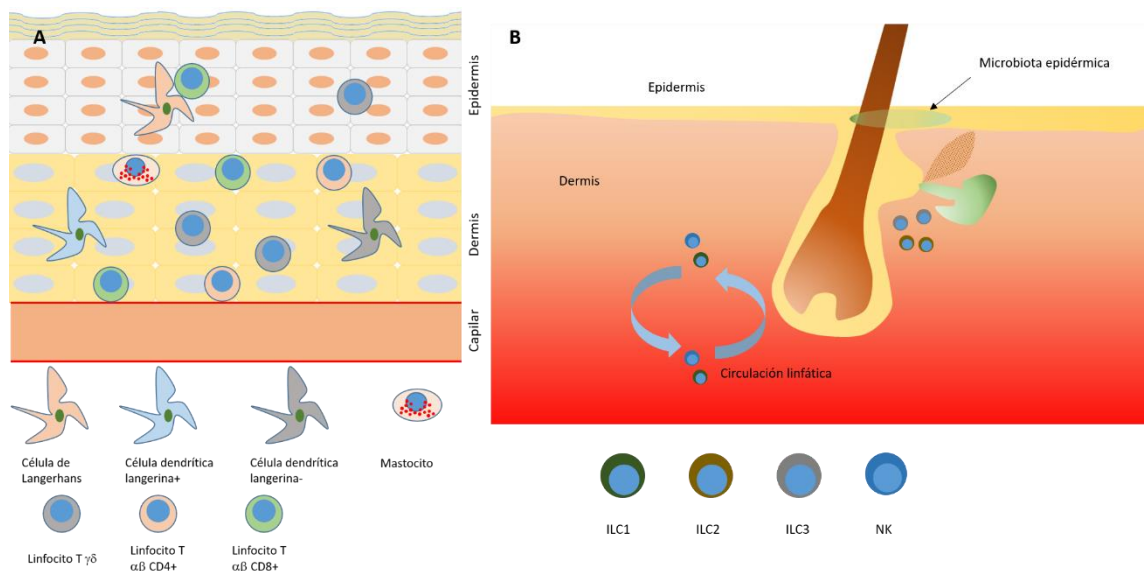


Figura 9: Distribución de células inmunitarias en la piel. A: En la epidermis se pueden apreciar células de Langerhans, linfocitos CD8 y algunos $\gamma\delta$ y en la dermis células dendríticas clásicas y langerina⁺, la mayoría de $\gamma\delta$, mastocitos junto a la epidermis y linfocitos $\alpha\beta$ junto a la epidermis y los vasos sanguíneos. B: Los ILC2 e ILC3 se acumulan junto a la glándula sebácea (cerca de la zona de mayor contacto con la microbiota) mientras que los ILC1 y NK circulan entrando a la piel y los ganglios.

Otra población importante son las células T, de las que hay en la piel el doble que en la sangre [100]. Los linfocitos T cutáneos son una población

propia, residente en la piel, que adquieren ese destino tras contacto con células dendríticas locales; y no células que circulen por el organismo al azar [101].

Los linfocitos $\alpha\beta$ son de fenotipo de memoria $CD8^+$ y residen junto a las células de Langerhans en la epidermis [102]. En la dermis, por su parte, hay igual número de $\alpha\beta$ $CD4^+$ y $CD8^+$ en los capilares y en la unión con la epidermis [103]. De los $CD4^+$, tanto Th1 como Th2 y Th17 tienen funciones importantes en este tejido barrera, y también hay una importante población (hasta un 10%) de linfocitos T reguladores [104], que circulan entre la piel y los ganglios incluso en estado de reposo [105].

De manera similar a cómo los tejidos linfoides asociados a mucosas (o MALT) funcionan en estas, se ha propuesto la existencia de tejidos linfoides asociados a la piel o SALT [106]. Sin embargo, no se ha descrito un tejido linfoide permanente en la piel; aunque sí que se han observado agrupaciones de células dendríticas y células T bajo la espongiosis epidérmica de la dermatitis de contacto. Esto ha llevado a formular la hipótesis de la formación de tejidos linfoides inducibles en la piel (iSALT) [107].

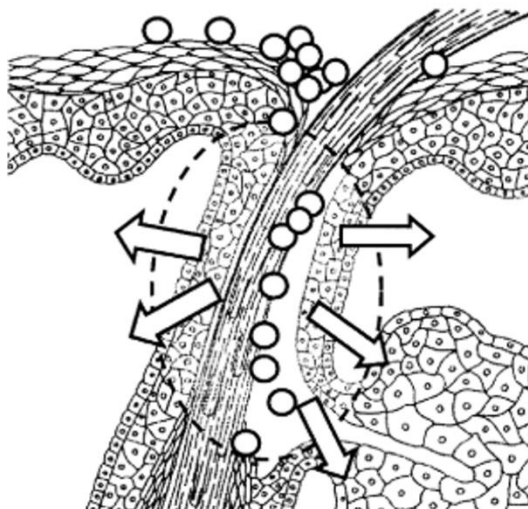
Otras células residentes, también presentes en mucosas, son los linfocitos T $\gamma\delta$ y NKT [108, 109]. Los linfocitos T $\gamma\delta$ cutáneos mantienen un estado preactivado, y son más abundantes en la dermis que en la epidermis, con función reguladora y antitumoral [110]. En ratón, el 90% son células T epidérmicas dendríticas $V\gamma5^+$ [111], pero no tienen esa morfología en humanos [110].

En común con las mucosas están también las células linfoides innatas o ILC. De estos linfocitos innatos, los ILC2 (análogos de Th2) y los ILC3 (grupo que incluye a ILC3 análogos de Th17 y a los LTi o inductores de tejido linfoide) son residentes en el tejido, mientras que los ILC1 (grupo que incluye células NK e ILC1 análogos de Th1) circulan entre los tejidos y los ganglios [112].

Estas ILC están enriquecidas junto a los folículos pilosos, en las cercanías de las glándulas sebáceas, limitando el crecimiento de estas con el TNF y linfotoxinas secretados por los ILC3. Sin ellos, se secretan ácidos grasos con un bajo contenido en péptidos antimicrobianos [113]. Por otra parte, ILC2

son importantes en el proceso de reparación de heridas [114], al que contribuyen las células de Langerhans y linfocitos T CD8⁺ productores de IL-17 [115, 116].

En contacto con la piel, por supuesto, está el microbioma, cuyos componentes comensales desempeñan una importante labor homeostática controlando la población de los patógenos [117] y mantienen una compleja comunicación con la piel [118]. El infundíbulo del folículo piloso es una zona de contacto entre este microbioma y las células del sistema inmunitario [119], ya que en su zona más interna se considera que su permeabilidad aumenta considerablemente [120], aunque hay veces que las bacterias penetran más profundamente, como es el caso del acné.



1. Entrada selectiva al infundíbulo
2. Alta concentración local
3. Liberación (e inicio de acción) controlada

Figura 10: Entrada selectiva de partículas en el infundíbulo. Este control de la entrada de microorganismos ayuda a coordinar la respuesta contra ellos de manera más precisa. Imagen modificada de Vogt et al. [120]

Resulta llamativo cómo un órgano como el folículo piloso sea, por un lado, un lugar de contacto con la flora comensal especialmente vigilado por las células ILC y, a un nivel más profundo, un órgano inmunoprivilegiado, lo que en teoría podría hacerlo más vulnerable a ataques víricos o de otros patógenos intracelulares al no haber expresión de HLA de clase I. Es digno de mencionar que las células NK e ILC1, grandes productoras de interferón γ (que estimula en gran medida la síntesis de HLA de ambas clases) no residen permanentemente en la piel como las ILC2 e ILC3.

En última instancia es esta respuesta de tipo 1, mediada por linfocitos T CD4⁺ de fenotipo Th1 y CD8⁺ citotóxicos y por sus equivalentes innatos ILC1 y NK, la que provoca la regresión del folículo piloso anágeno. Este tipo de respuesta, orientada a infecciones víricas y tumores, provoca la apoptosis como reacción a la presentación de antígenos intracelulares por el HLA de clase I. La producción de interferón por parte de estas células promueve la expresión de HLA, lo que contrarresta el privilegio inmunológico del folículo piloso. Esto provoca una acumulación de células NK junto al folículo, aunque se ha observado que las causantes reales de la patología son las células CD8⁺ [121].

4 Privilegio inmunológico y patogenia de alopecia areata

4.1 Privilegio inmunológico

El privilegio inmunológico o inmunoprivilegio se da principalmente en tejidos que sufrirían daño irreparable tras una reacción inflamatoria, pero en los pocos casos conocidos (sistema nervioso central, feto, córnea...) varían las características de este privilegio [122]. Los puntos en común se definen como una combinación de, por un lado, expresión baja o ausente de HLA de clase I o β 2 microglobulina (lo que impide la presentación de antígeno propio a los linfocitos T CD8⁺) y, por otra parte, la formación de un medio inhibitorio por la secreción de inmunosupresores [123].

4.2 Patogenia de la alopecia areata

Estos mecanismos se dan en la protuberancia y el bulbo del folículo piloso, pero se pierden en la alopecia areata, donde hay un aumento de MICA y ULBP y en consecuencia un acúmulo de células NK y, a veces, de linfocitos T CD8⁺ [122]. Tras una inflamación perifolicular durante la fase anágena hay una distrofia de la raíz capilar que lleva a una rotura del pelo y a la entrada prematura en fase catágena [124]. Los queratinocitos HLA-Ia/ β 2 negativos presentes en la raíz en fase anágena son el objeto de esta pérdida de privilegio, que se puede recuperar tras la continuación del ciclo si el factor que provocó la inflamación no persiste [122].

La reacción inicial puede deberse al reconocimiento de un antígeno específico por parte de linfocitos T CD8⁺, pero puede ser desencadenado también por las células NK, lo que lleva a pensar en distintas variantes de alopecia areata: La autoinmune (AAA) procedería de este reconocimiento específico de moléculas relacionadas con la melanogénesis, mientras que otras tendrían un origen inespecífico, pero en todo caso la consecuencia sería un aumento dañino de interferón γ , que estimula la síntesis de HLA, por una vía o la otra [28].

No sólo la pérdida del inmunoprivilegio es iniciadora de la enfermedad, sino que esta se mantiene hasta que dicho privilegio se recupera. Así, los inhibidores de JAK/STAT como tofacitinib, aparte de inducir directamente la fase anágena, anulan el efecto del interferón γ y causan una rápida recuperación en la alopecia areata [125].

Las Janus quinasas (JAK) se asocian a los receptores de citoquinas de la familia de la hematopoyetina, a la que pertenecen los interferones, y son las responsables de transmitir la señal a los transductores de señal y activadores de transcripción (o STAT), que son los segundos mensajeros [126].

Esto es indicativo de que el interferón γ es el responsable de la pérdida de privilegio inmunológico. El efecto del IFN- γ es el aumento de expresión de HLA; lo que, a todos los efectos, anula este privilegio. Lo producen los linajes de células linfoides de tipo 1 (defensa contra patógenos intracelulares), como Th1, CD8⁺, NK e ILC1 [127].

La activación de estos linajes celulares provoca una inflamación en el folículo piloso, pero en ningún caso una destrucción de este, sino que se produce una distrofia que acelera la entrada en fase telógena [30]. Como consecuencia de esto, la interrupción del proceso inflamatorio (como es el caso al bloquear las señales intracelulares de IFN- γ) tiene el efecto de restaurar el ciclo capilar normal.

5 El Complejo Mayor de Histocompatibilidad en humanos

El complejo mayor de histocompatibilidad (*MHC*), recibe en humanos el nombre de “antígeno leucocitario humano” o *HLA*. Se trata de un grupo de genes presentes en el cromosoma 6 relacionados con la presentación de péptidos (procedentes de la degradación de antígenos propios o extraños) a los linfocitos T $\alpha\beta$ clásicos por parte de las células presentadoras de antígenos o APC [1, 128].

Hay dos tipos de proteína de HLA (clase I y clase II), y ambas se caracterizan por ser heterodímeros proteicos con un total de cuatro dominios inmunoglobulina, dominio transmembrana y una hendidura en la que se acopla el péptido a presentar. En el caso del HLA de clase I, presenta un péptido de origen citoplasmático (normalmente propio) de 8 a 10 aminoácidos de longitud, mientras que el HLA de clase II presenta péptidos de 13 a 25 aminoácidos procedentes de proteínas de origen extracelular (normalmente procedentes de vesículas endocíticas) [129].

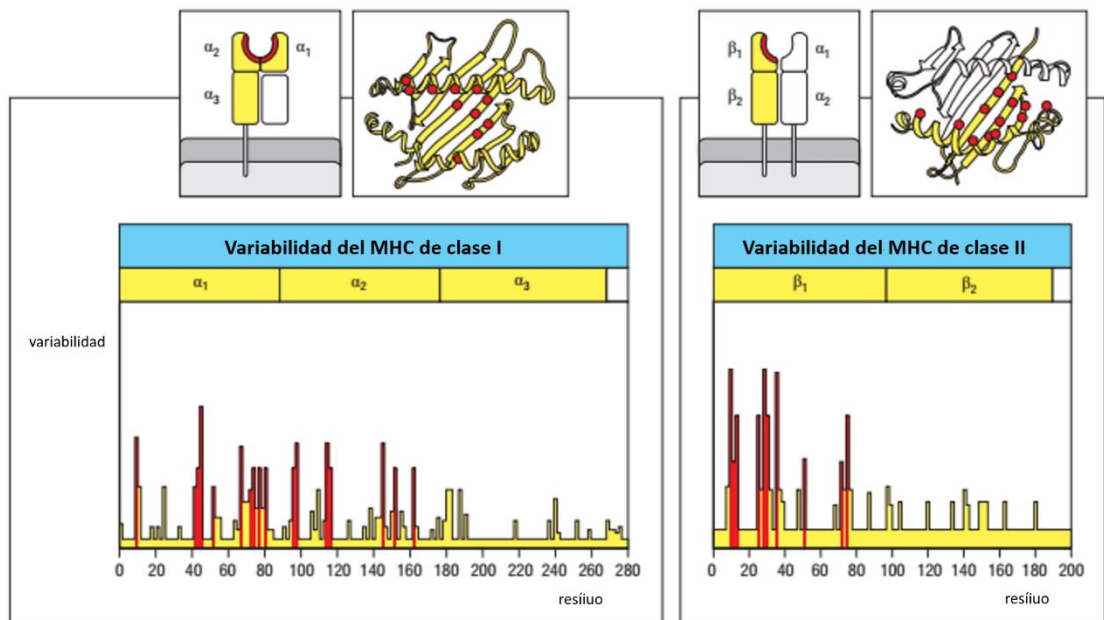


Figura 11: Estructura de las moléculas de MHC. En rojo se muestran los residuos con mayor variabilidad. Imagen modificada de Janeway's Immunobiology [1]

El HLA de clase I, presente en todas las células nucleadas, es un heterodímero de una cadena α con 3 dominios inmunoglobulina (α_1 , α_2 y α_3) y un dominio β_2 microglobulina. La hendidura de unión al péptido está entre los

dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$, mientras que el dominio transmembrana se encuentra a continuación del dominio $\alpha 3$. Este último dominio es el ligando de la molécula CD8 de los linfocitos T citotóxicos, por lo que son éstos los que reconocen las moléculas presentadas por HLA de clase I [129].

Por otra parte, el HLA de clase II, presente sólo en APC profesionales, está formado por una cadena α y una β , con 2 dominios inmunoglobulina cada uno. La hendidura de unión está formada por los dominios $\alpha 1$ y $\beta 1$, y los dominios transmembrana se encuentran tras los dominios $\alpha 2$ y $\beta 2$. La molécula CD4 de los linfocitos T auxiliares o helper se une al dominio $\beta 2$, de modo que son éstos los que reconocen el complejo péptido-HLA clase II [129].

El receptor de células T (TCR) debe reconocer no sólo al péptido, sino también a la proteína HLA que lo está presentando [129]. Al igual que los anticuerpos, el TCR está sujeto a un proceso de recombinación somática del ADN, lo que da un amplio abanico de especificidades en un mismo paciente. El HLA, sin embargo, no pasa por este mismo proceso, sino que es su carácter poligénico y altamente polimórfico en la población [130].

El espectro de antígenos distintos que se pueden presentar mediante cada tipo de HLA en un mismo individuo es más amplio de lo que podría ser gracias al hecho de que una misma persona suele expresar hasta seis variantes distintas de HLA de clase I, que se halla repetido en tres loci (locus A, locus B y locus C); mientras que el de clase II está en otros tres loci (DP, DQ y DR, cada uno dividido en un locus para la cadena α y otro para la β), lo que resulta en hasta 10 moléculas diferentes, al poder combinarse las cadenas α y β de un mismo locus de forma cis (las del mismo cromosoma) o trans (una de cada cromosoma) excepto en DR, cuya cadena α es invariante y solo hay dos moléculas diferentes según su cadena β . Al haber un alto grado de polimorfismo en cada uno de los loci, en poblaciones sin un alto grado de endogamia no es muy frecuente la homocigosis [131].

Algunas moléculas solubles bacterianas o virales ancladas a la membrana celular son presentadas de otra manera: Se unen íntegras por fuera de la hendidura enlazando a regiones de las moléculas HLA de clase II con

otras características de familias de V beta del TCR, provocando una activación de los TCR de estas familias. Estas moléculas son llamadas superantígenos [132] y generan una respuesta rápida y con un amplio espectro de TCR que después tiene que ajustarse al antígeno microbiano o viral más específico.

Debido al rol de las moléculas HLA en la presentación de antígenos, se dan casos en los que un antígeno es presentado con mucha mayor eficiencia en pacientes que expresan ciertos alelos que en otros; tanto para bien (presentando antígenos de virus que otros alelos no reconocen) como para mal (presentando antígenos propios en reacciones autoinmunes). Son conocidas las asociaciones genéticas de los alelos *HLA-B27* con espondilitis anquilosante, y *HLA-DQ2* y *DQ8* con celiaquía, mientras que *HLA-B18* es un factor de protección del contagio del VIH de la madre al lactante [133].

Genéticamente, el complejo MHC se divide en tres regiones [134]. En la región MHC-I están los genes de HLA de clase Ia o clásicos (*HLA-A*, *HLA-B* y *HLA-C*) y otros relacionados con estructura similar (algunos de los cuales codifican para proteínas que se unen a β 2-microglobulina, como los genes *HLA-E*, *HLA-F* y *HLA-G*, y otras, como las codificadas por los genes *MICA* y *MICB*, no la incorporan), conocidos como genes *MHC* de clase Ib (no clásicos) [135]. Hay otros genes de esta familia fuera del complejo MHC, como es el caso de los genes *CD1*, *MR1* o *ULBP*. *MICA*, concretamente, está en estrecha cercanía al locus *HLA-B*.

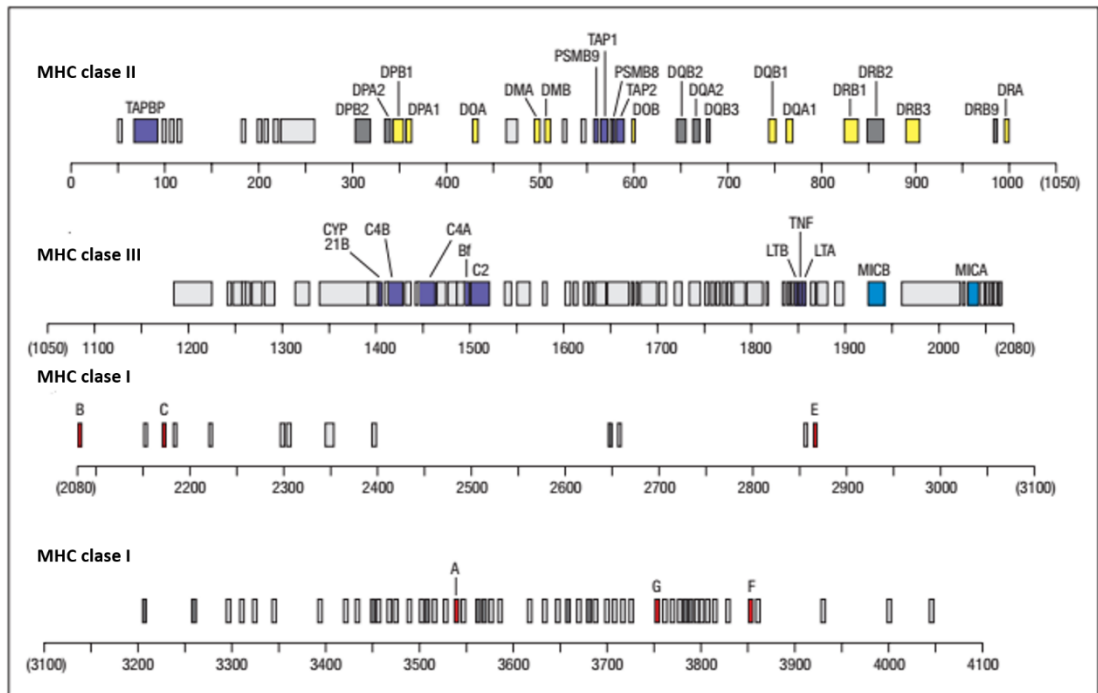


Figura 12: El complejo MHC en detalle. Los genes MHC de clase I se muestran en rojo excepto los MIC, que están en azul. Los genes MHC de clase II de importancia inmunológica están en amarillo. Otros genes de la región MKC con función inmunitaria se muestran en morado y los pseudogenes relacionados con genes inmunitarios en gris oscuro. En gris claro se muestran otros genes no relevantes para el sistema inmunitario. Imagen modificada de Janeway's Immunobiology [1]

En la región MHC-II están los genes HLA de clase II (*HLA-DP*, *HLA-DQ* y *HLA-DR*) y otros similares como *HLA-DM*, *HLA-DO* y los genes de la tapasina, proteína crucial en la maduración del HLA de clase I [136].

Entre ambas regiones está la región MHC-III, que codifica para diferentes proteínas como el factor de necrosis tumoral, las linfotoxinas y los factores del complemento C2, C4 y B [134]. Es aquí, en estrecha cercanía con la región MHC-I y el locus *HLA-B*, donde está *MICA* y, a corta distancia, *MICB*.

La síntesis de HLA de ambas clases requiere la presencia de un péptido para presentar. En el caso de HLA de clase I, tras sintetizarse en el retículo endoplasmático, se une calnexina para estabilizar hasta la unión de la $\beta 2$ microglobulina. Tras ello, la calnexina es sustituida por calreticulina, ERp57 y tapasina [137], propiciando que se unan péptidos procedentes de la degradación de proteínas endógenas en el proteasoma [138] o, en el caso de las células dendríticas, las proteínas pueden proceder de fragmentos de otras células en fagolisosomas en un proceso de presentación cruzada [128, 139]. El

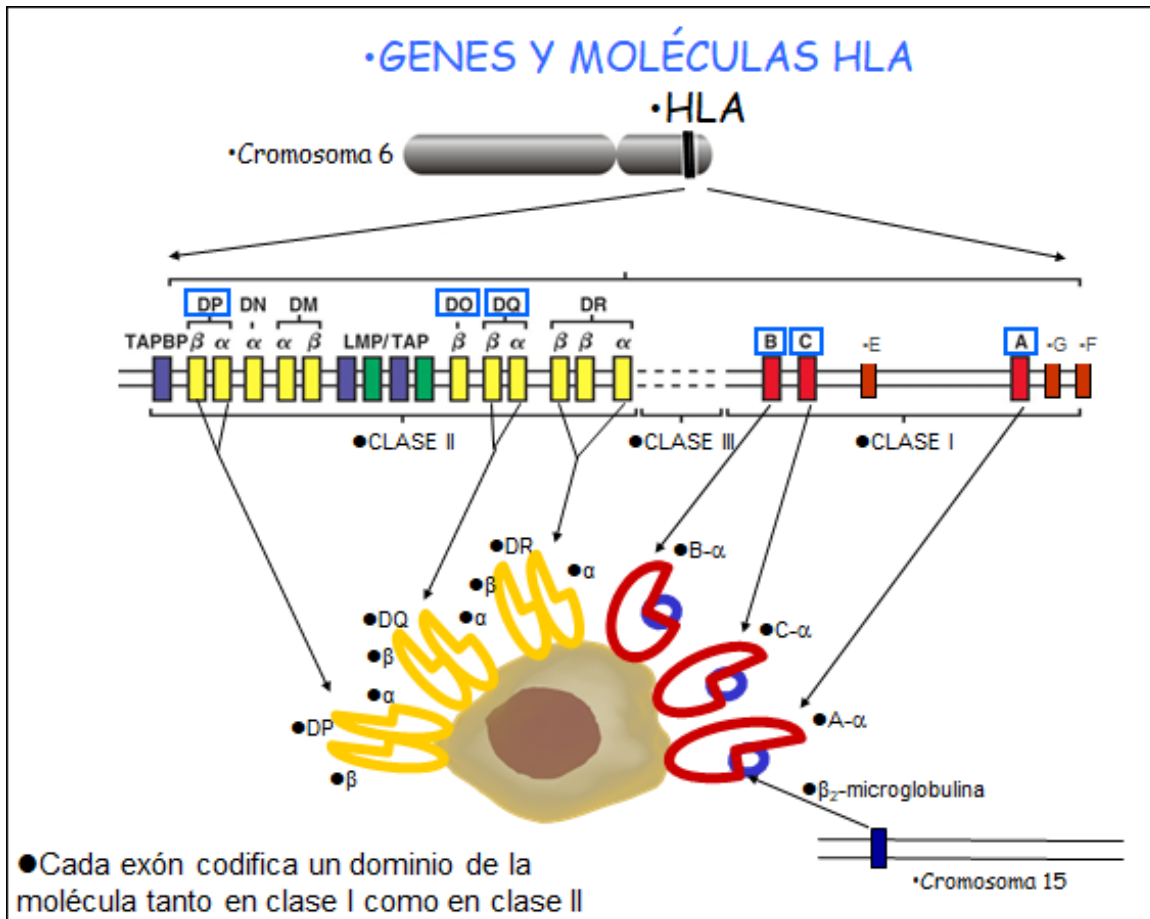


Figura 13: Genes del MHC y moléculas para las que codifican. Las moléculas de clase I aparecen en rojo (con la β_2 -immunoglobulina en azul) y las de clase II en amarillo. Imagen modificada a partir de [1]

interferón gamma estimula la producción del activador del proteasoma PA28 [138].

Los péptidos entran por medio de las proteínas TAP1 y TAP2 (transporters associated with antigen processing). Estas están unidas a la tapasina por el lado del RE y tienen un dominio ABP (ATP binding protein) en el citosol [140]. Tras su entrada son procesados por ERAAP (endoplasmic reticulum aminopeptidase associated with antigen processing) [141]. Una vez unidos, el HLA es transportado en una vesícula hacia la membrana.

El HLA de clase II debe presentar proteínas exógenas, así que hasta su obtención, la molécula está unida a Ii (cadena invariante). Esta está anclada a la membrana del RE por su extremo amino terminal y forma trímeros con otros complejos de cadena invariante con HLA por el extremo carboxi terminal. Hasta que estos trímeros están formados, las cadenas están vinculadas a calnexina. Al completarse, se liberan de esta y son transportadas fuera del RE [142].

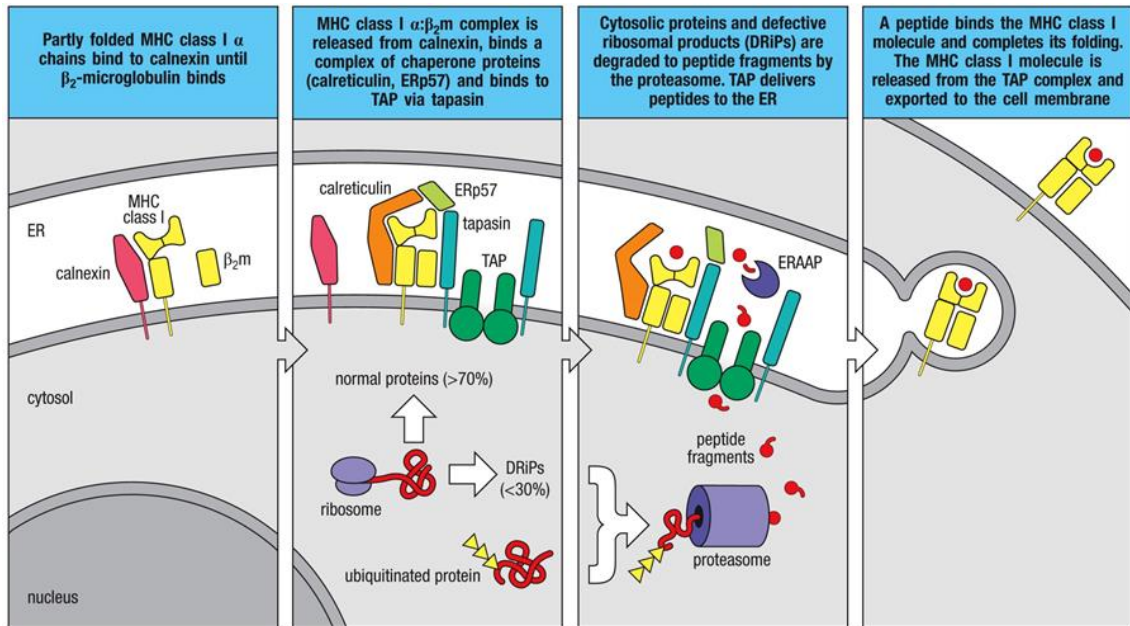


Figura 14: Plegamiento y adquisición del péptido del HLA de clase I. La calreticulina reemplaza a la calnexina una vez que el plegamiento se ha completado y se ha unido la β_2 -immunoglobulina, la tapasina ancla la molécula junto a TAP y calreticulina junto a ERp57 impiden la unión de cadenas péptidas indeseadas. Cuando el péptido entra al retículo endoplasmático a través de TAP y es editado por ERAAP, se une al MHC y las chaperonas se separan [1].

El extremo amino terminal de li sirve como señal para transportar el complejo a los endosomas tempranos (procedentes del exterior o, a veces, de procesos de endofagia [128]), donde li es lisada por proteasas ácidas en dos etapas para dar LIP22 y luego LIP10 [143]. Al carecer del extremo carboxi terminal, se deshacen los trímeros de complejos HLA-LIP10. Tras un procesamiento posterior, se rompe LIP10, quedando solo el fragmento CLIP (class II-associated invariant chain peptide) en la hendidura de unión del HLA y dejando de estar anclado a la membrana [142].

En los endosomas está presente HLA-DM, similar a las moléculas de HLA de clase II. Esta se une a la molécula unida al péptido, permitiendo su separación y su intercambio por un péptido de mayor afinidad presente en el endolisosoma. Otra molécula similar, HLA-DO, se encuentra unida a HLA-DM y compete con el HLA de clase II para unirse a esta, regulándola negativamente en consecuencia. El interferón gamma regula positivamente la producción de

HLA-DM, pero no la de HLA-DO [144].

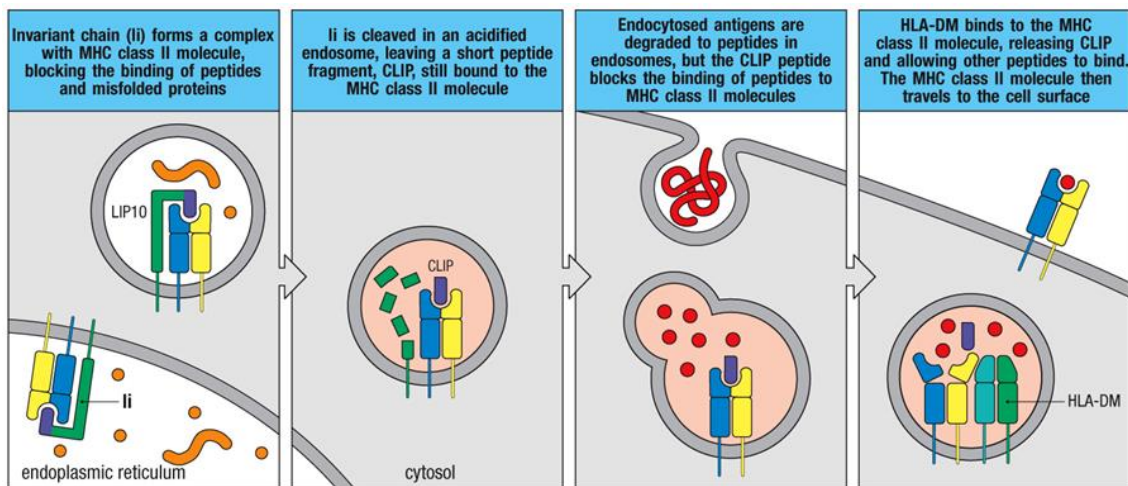


Figura 15: Maduración de MHC de clase II y adquisición del péptido. LIP10, unido al MHC, impide la unión de péptidos endógenos. En el endosoma acidificado, se degrada dejando solo la cadena CLIP unida al MHC. Al fusionarse con vesículas de endocitosis y degradar los antígenos exógenos, HLA-DM se une para que se separe CLIP y se puedan unir estos, fusionándose posteriormente el endosoma con la membrana celular para presentar el péptido [1].

6 Receptores de los linfocitos NK

Como se ha mencionado, *MICA* y *MICB* (MHC Class I-like A y B) son genes que pertenecen al grupo de MHC-Ib. Codifican para una cadena pesada cuya estructura es similar a la de HLA de clase 1 que no requiere $\beta 2$ -microglobulina para su expresión. La expresión de estos genes es inducida por estrés celular y las proteínas codificadas por ellos son ligandos del receptor NKG2D de células NK. Este es un receptor KLR (killer cel lectin-like receptor) de tipo lectina C cuya activación provoca una señal estimuladora por

asociación con DAP10. Otro ligando conocido de NKG2D es RAET1, cuya

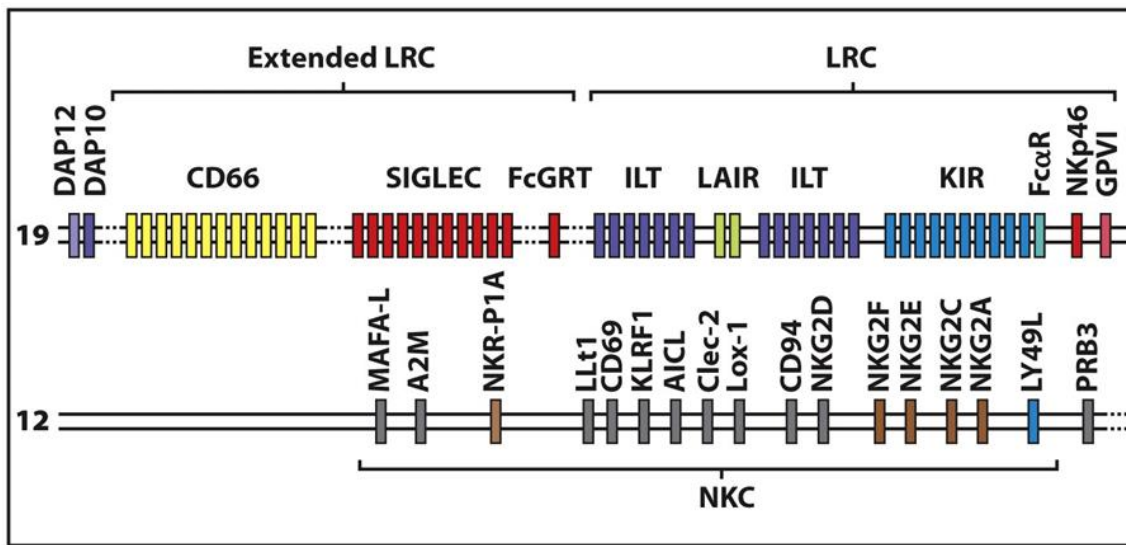


Figura 16: Genes de los receptores de células NK. Los NKC se encuentran agrupados en el cromosoma 12 y los LRC en el cromosoma 19 [1].

estructura es similar a los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ del HLA de clase I [145].

NKG2D es distinto a los otros receptores de la familia NKG2 y, mientras que estos (NKG2A, C, E y F) son codificados por *KLRC1-4*, el gen que codifica para NKG2D es *KLRK1*. Mientras que los demás forman heterodímeros con CD94, NKG2D forma homodímeros. Además, mientras que el efecto inhibitorio de NKG2A se debe a 2 ITIM que lleva incorporados y el de NKG2C se lleva a cabo mediante asociación con DAP12, que es un homodímero con 1 ITAM en cada cadena, el de NKG2D se lleva a cabo mediante los ITAM de DAP10 (muy similar a DAP12) [145].

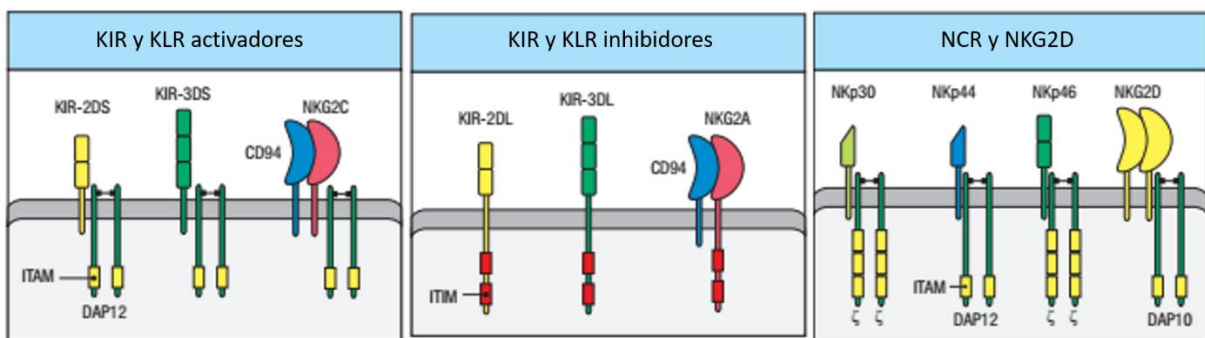


Figura 17: Receptores NK de las familias KIR y KLR (izquierda y centro). Ambas familias contienen tanto miembros activadores como miembros receptores. Por otra parte, los NCR (también relacionados con las inmunoglobulinas) y el NKG2D (un miembro único de la familia KLR) se encuentran también en la superficie de las células NK como activadores. Imagen modificada de Janeway's Immunobiology [1]

Esta vía de señalización es atípica en los receptores de membrana de linfocitos NK. En ellos, las señales de activación suelen ser mediante receptores asociados a DAP12 o a la cadena ζ de CD3. Así, los KIR (Killer cell immunoglobulin-like receptor) son moléculas con 2 o 3 dominios inmunoglobulina de las cuales algunas son activadoras y otras inhibitoras, reflejando su nombre el tipo al que pertenece así como su número de dominios inmunoglobulina. KIR-2DS y KIR-3DS son estimuladoras, por ejemplo, y se unen a DAP12, mientras que KIR-2DL y KIR-3DL tienen cada uno 2 ITIM en su región citoplasmática, lo que les otorga una función inhibitora [145]. Reconocen como ligando el HLA de clase I, principalmente HLA-C, y el péptido que está unido influye en este reconocimiento [146].

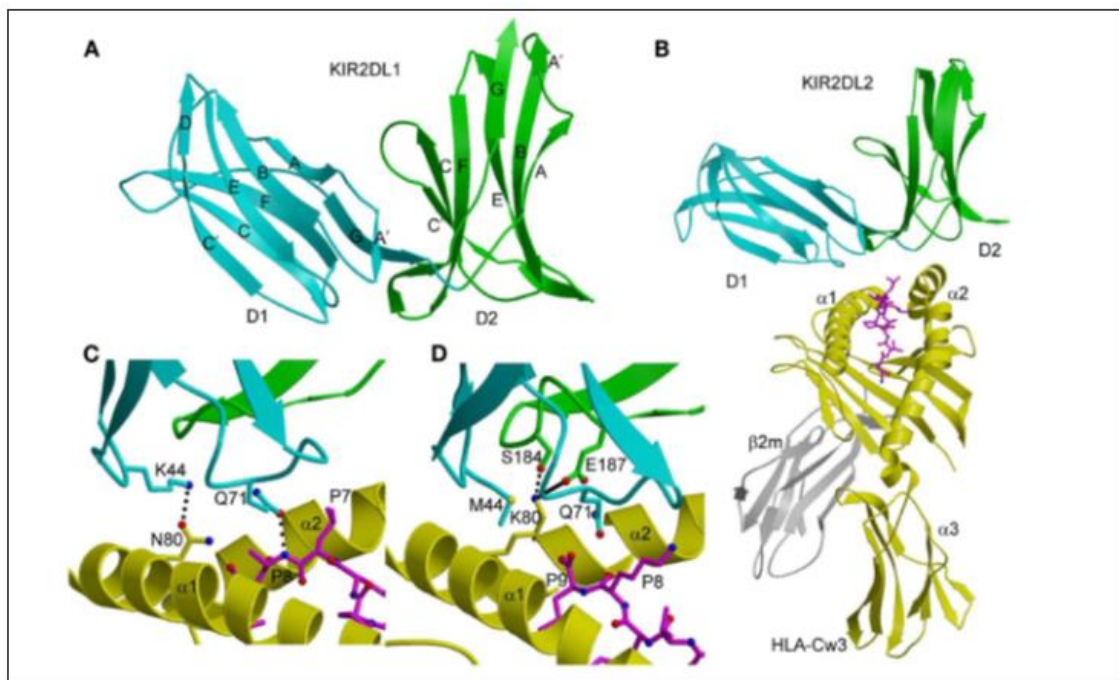


Figura 18: Estructura tridimensional de KIR2DL1 (A); de KIR2DL2 unido a HLA-Cw3, que está presentando un péptido (B); enlaces de hidrógeno (las líneas punteadas) entre la lisina 4 de KIR y la asparagina 80 de HLA-Cw3, y entre la glutamina 71 de KIR y P8 del péptido (C); enlaces de hidrógeno (línea punteada) y salino (línea continua) entre la lisina 80 del HLA-Cw3 y KIR2DL1 (D). El dominio D1 de KIR2DL1 se muestra en cian, y el D2 en verde. HLA-C se muestra en amarillo y el péptido en rosa [2].

Otras moléculas activadoras son los NCR (Natural cytotoxicity receptor) NKp46, de estructura similar a los KIR con 2 dominios inmunoglobulina y que une la cadena ζ ; NKp30, con estructura de un dominio variable de inmunoglobulina, que también se une a ζ ; y NKp44, similar a NKp30, que se

une a DAP12 [145].

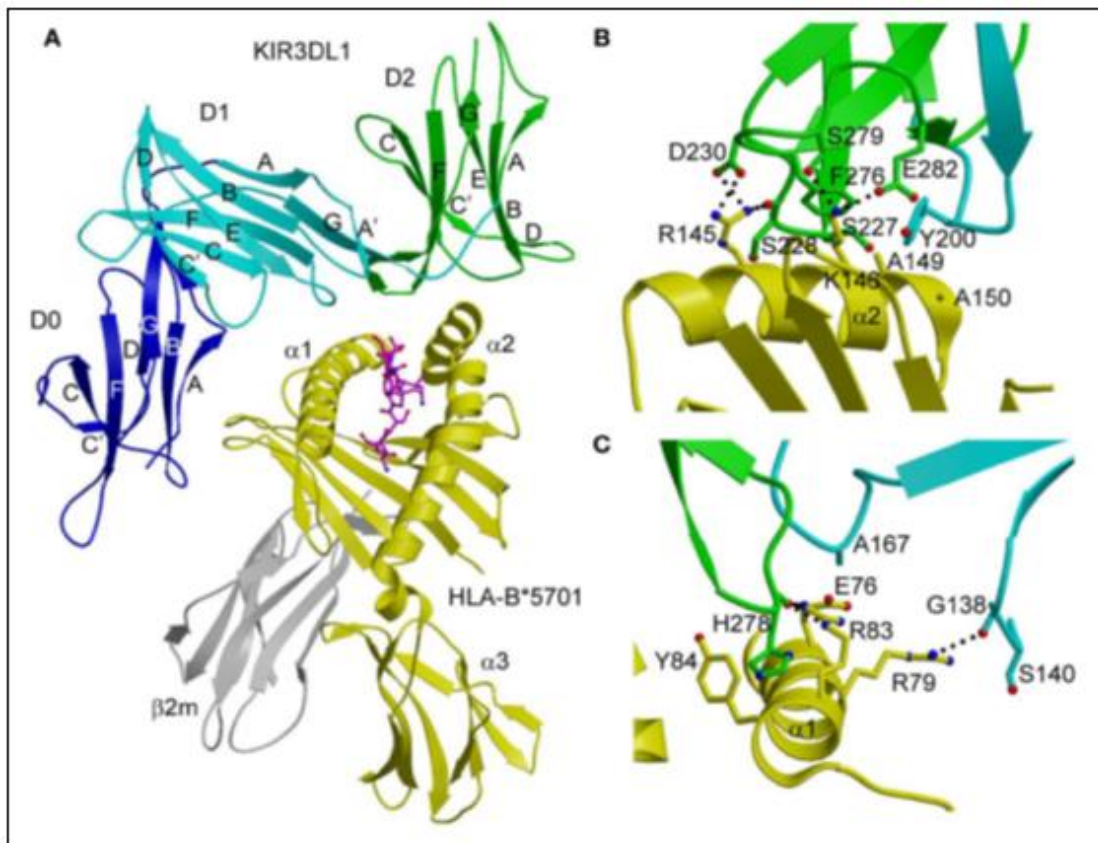


Figura 19: Estructura tridimensional de KIR3DL1. Los dominios de KIR3DL1 se muestran en azul D0, en cian D1 y en verde D2; mientras que HLA-B*5701 se muestra en amarillo con la beta-2 microglobulina en gris y el péptido presentado en rosa (A). Se muestran detalles de la interacción de KIR3DL1 con la cadena $\alpha2$ de HLA-B*5701 (B) y con la cadena $\alpha1$ (C) [2].

Todos estos receptores se dividen en dos familias. Por un lado, en el cromosoma 19, está el LRC (leucocyte receptor complex), en el que se incluyen los genes de los KIR junto a NKp46 (que, recordemos, es similar a ellos), ILT (immunoglobulin-like transcript) y LAIR (leucocyte-associated immunoglobulin-like receptor). En el cromosoma 12 está el NKC (NK receptor complex), que incluye a los genes que codifican para KLR y para CD49. Los genes de NKp30 y NKp44 están en el MHC, en el cromosoma 6 [145].

Las células NK no expresan todos estos receptores simultáneamente, sino que su expresión es variable entre distintas células y hay en el mismo individuo distintas poblaciones de NK con variedad de receptores, habiendo incluso procesos de memoria [147]. Como los KIR reconocen distintas formas de HLA, cada población reconoce la presencia o no de un HLA concreto (influido por el péptido incorporado, como se vio antes), en el organismo. Los

KLR, por otra parte, normalmente detectan el nivel general de expresión de HLA al reconocer la molécula invariante HLA-E, mientras que NKG2D detecta niveles de estrés al detectar ligandos expresados ante este [145].

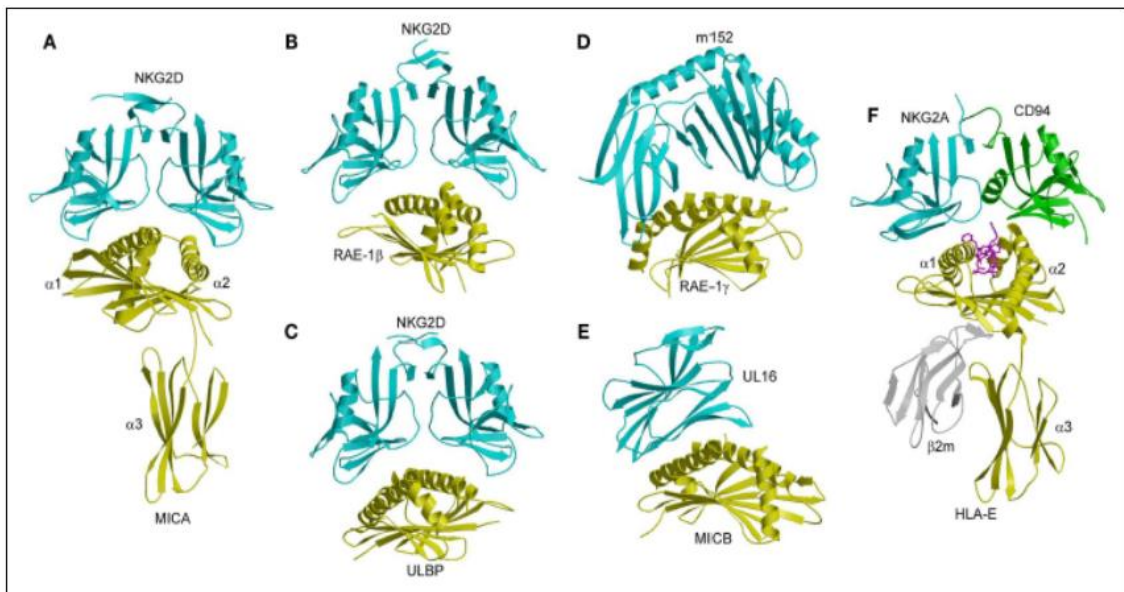


Figura 20: Estructura tridimensional de los KLR. Vemos NKG2D en cian y MICA (A), RAE-1 β (B) o ULBP (C) en amarillo. También vemos las inmunoevasinas: m152 en cian unida a RAE-1 γ en amarillo (D) y UL16 en cian unida a MICB en amarillo (E). Finalmente vemos el heterodímero de NKG2A en cian y CD94 en verde unido a HLA-E en amarillo con β_2 inmunoglobulina en gris y el péptido presentado en rosa (F) [2].

Se han visto asociaciones entre infecciones víricas y aumentos de poblaciones de células NK con NKG2C (un receptor activador) y una expresión de KIR autorreactivos inhibidores [148], lo que podría llevar quizá a ver los KIR y KLR como un equivalente innato al TLR: la estimulación de un KIR que no es reactivo al HLA propio en circunstancias normales puede ser achacada a la presentación de un péptido extraño, mientras que la no detección de un HLA reactivo (lo que llevaría a no estimular los KIR inhibidores) en una célula con expresión normal de HLA (lo que estimularía a NKG2C) se puede deber a que esté presentando péptidos diferentes a los que se le suelen asociar en circunstancias normales, en este caso los víricos. En resumen, podría tratarse de un reconocimiento en la variación en el patrón de presentación de antígeno.

Además de los KIR y la mayoría de KLR, que parecen reconocer el patrón de expresión de HLA, y de NKG2D, que reconoce señales de estrés, las células NK reciben otra señal más para matar una célula objetivo: su receptor de inmunoglobulina G de baja afinidad (IgGRIII, también llamado CD16), que

les permite ejercer como células efectoras de la inmunidad adaptativa al matar células reconocidas por anticuerpos de isotipo IgG1 o IgG3 [149].

La reacción que nos interesa, sin embargo, es el reconocimiento de MICA por NKG2D en situaciones de estrés, como nos muestran los estudios genéticos existentes.

7 Estructura de MICA

Como ya se ha mencionado antes, MICA es una molécula de la familia del HLA de clase I con tres dominios inmunoglobulina ($\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$) y una región transmembrana, pero sin unir $\beta 2$ microglobulina ni presentar péptido [150]. Se han identificado varios alelos del gen, que se pueden agrupar según si la proteína tiene en posición 129 una metionina o una valina, y esta última conlleva una menor afinidad por NKG2D [151].

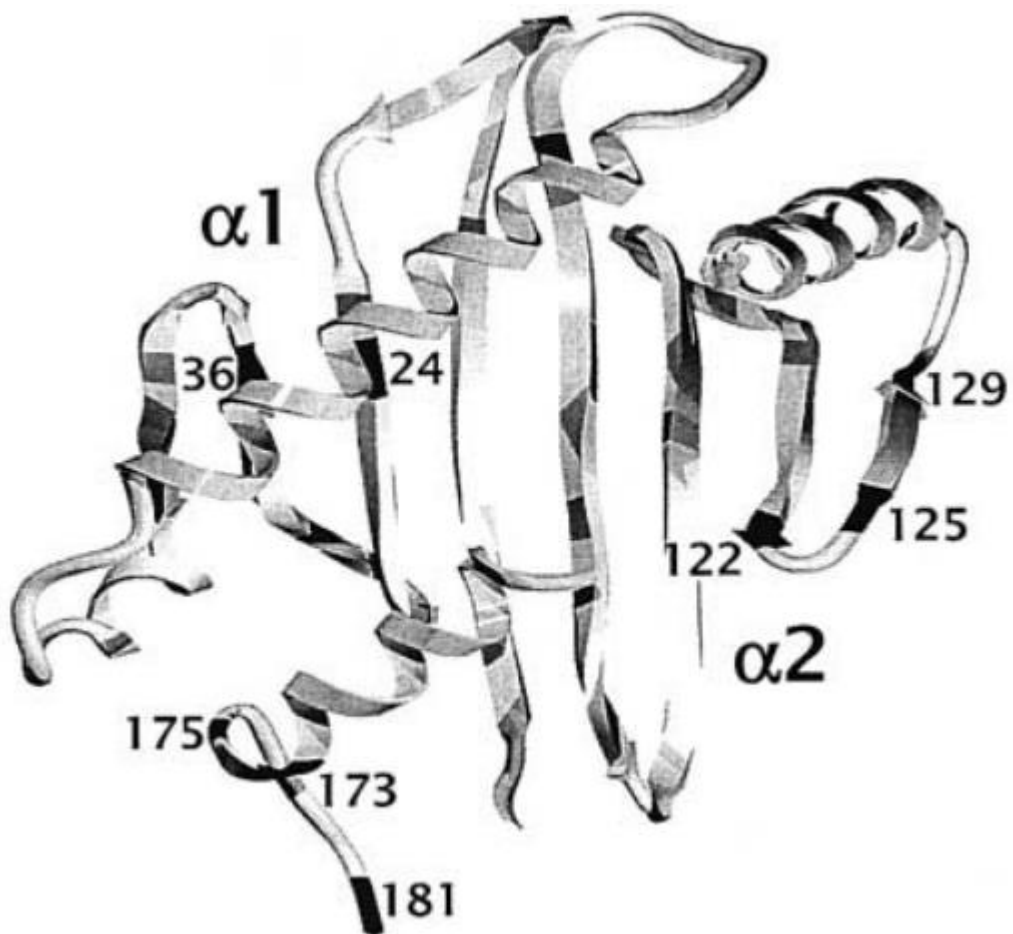


Figura 21: Estructura de la proteína MICA. Imagen de Steinle et al. [151]

En la región del gen que codifica para esta región transmembrana hay un triplete GCT que se encuentra repetido un número variable de veces: una repetición corta en tándem o STR [152]. Los diferentes alelos según el STR reciben nombres que corresponden con el número de veces que se encuentra este triplete repetido: *MICA*A4*, *MICA*A5*, *MICA*A6* y *MICA*A9* y el número de alaninas consecutivas en la región transmembrana de la proteína que codifican. Por otra parte, *MICA*A5.1* es un alelo en el que, además de las cinco repeticiones, hay una guanina adicional, lo que provoca un cambio de marco de lectura y una región transmembrana truncada por un codón de stop [152].

En otra sistemática, los alelos, según la secuencia de aminoácidos, reciben el nombre *MICA*00X*, donde X es un número que varía según de qué alelo hablemos [153]. Así, los alelos *MICA*001* (metionina en posición 129), *MICA*007* (a menudo metionina) y *MICA*012* son variantes de *MICA*A4*; *MICA*010* y *MICA*016* (valina en 129) son *MICA*A5*; *MICA*004* (a menudo valina en 129), *MICA*006* y *MICA*009* son *MICA*A6*; *MICA*002* y *MICA*015* son *MICA*A9*, y *MICA*008* (valina en 129) es *MICA*A5.1* [151, 153].

8 Genética de la alopecia areata

Ya se ha mencionado la existencia de un factor genético en esta enfermedad, que se puede deducir tanto por la alta frecuencia de casos en los que hay un familiar afectado [37] como por la alta coincidencia entre gemelos univitelinos [36]. Esto ha dado pie a varios estudios genéticos.

8.1 Relación de MICA con alopecia areata

El más relevante es un estudio de asociación genómica (GWAS) de Petukhova et al. realizado mediante secuenciación masiva [154]. Esta investigación descubrió asociación de variable significación entre la enfermedad y multitud de mutaciones puntuales en distintos genes.

La asociación más importante fue la de *HLA-DRB1*, parte de uno de los tres loci que codifican para la cadena β del HLA de clase II (el locus *HLA-DR*) [154]. También *HLA-DQ*, fuertemente asociado a *HLA-DR*, mostró asociación con la enfermedad, así como los genes que codifican para HLA de clase I [154].

Otra región relacionada incluye a parte de los genes *ACOXL* (perteneciente a la familia de genes de acil-coenzima A oxidasa) y *BCL2L11* (*Bcl2-like11*, también llamada BIM). Es probable que esta asociación esté más relacionada con BIM, ya que es una proteína que participa en procesos de apoptosis [154].

Una tercera región relacionada incluye al gen *GARP*, de expresión en linfocitos T reguladores, y también en folículos pilosos. Su anulación en los Treg anula su función inmunosupresora [154].

Además, este estudio halló relación con la enfermedad al gen *SH2B3*, que codifica para la proteína también conocida como LNK, que regula negativamente en respuesta a citoquinas mediante tirosín quinasas y JAK [154].

El estudio de GWAS también halló una asociación con *MICA*, pero esta técnica está limitada a detectar polimorfismos de un nucleótido o SNP. Al estudiarse los alelos de *MICA* según el polimorfismo STR en una cohorte estadounidense (de la universidad de Texas), se encontró una asociación clara con la enfermedad con el alelo *MICA**A6 y una evidencia sugestiva de relación de *MICA**A5.1 con la variante parcheada [155].

8.2 MICA en otras enfermedades

Dado el interés de *MICA* en esta enfermedad, no es sorprendente que se halle también relacionado con otras enfermedades autoinmunes.

*MICA**6 se relaciona con la enfermedad de Behcet [156], clasificada como autoinmune sistémica. *MICA**A9, por su parte, ha sido relacionado con una mayor incidencia de psoriasis y artritis psoriásica, con el interés añadido de tratarse de otra enfermedad cutánea autoinmune [157].

Este mismo alelo se ha hallado relacionado con carcinoma nasofaríngeo [158] y con una variante agravada de la fiebre mediterránea familiar [159]. En ambos casos se puede hallar una relación del sistema inmunitario, tanto en la respuesta al cáncer como en la enfermedad autoinflamatoria.

Además, *MICA**A9 en asociación con el haplotipo *HLA-DQ8/DR4* se ha relacionado con la diabetes mellitus de tipo 1 [160], otro desorden autoinmune.

Por otro lado, este mismo alelo ha sido asociado con menor incidencia de artritis reumatoide; en este caso, este efecto se ha hallado en asiáticos, pero no en europeos [161]. Combinado en el genotipo con *MICA**A5, sin embargo, parece ser un factor protector contra cáncer en caucásicos y no en asiáticos [162]; lo que, combinado con lo anterior, indica una curiosa diferencia en el comportamiento de MICA en ambas poblaciones.

El alelo *MICA**5.1 se ha relacionado también con un mayor riesgo de cáncer de páncreas y mayor presencia de MICA soluble, como es lógico dado el truncamiento de su región transmembrana [163].

Otro estudio muestra que *MICA**A4 es un factor de protección contra la colitis ulcerosa, y que *MICA**A5.1, por otra parte, está relacionado con la aparición de abscesos, teniendo este último influencia sobre la edad de aparición de la enfermedad [164].

8.3 Relación de HLA de clase I y alopecia areata

De entre todos los loci de HLA, el que está en ligamiento más estrecho con MICA es *HLA-B* [134]. En cualquier estudio genético sobre *MICA* es, pues, de interés tener en cuenta la influencia que pueda tener este sobre el resultado.

Ya en los setenta se describió una asociación entre el alelo *HLA-B12* con alopecia areata en una cohorte finlandesa [165]. En una cohorte judía, sin embargo, la asociación se halló con *HLA-B18* [166]. En Turquía, dos estudios hallaron relación de alopecia areata con *HLA-B62* [167, 168], mientras que en chinos Han es *HLA-B52* el que parece estar relacionado [169] y en Brasil no se halló relación con alelo alguno [170]. Toda esta variabilidad hace pensar que el efecto de *HLA* podría ser debido a la influencia de otros factores genéticos, o incluso que podría ser un resultado engañoso debido al ligamiento con *MICA*.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

La expresión de las moléculas MICA en el folículo piloso inducida por un estímulo estresante, permite su reconocimiento mediante el receptor NKG2D de las células NK y de los linfocitos T CD8 citotóxicos que se activan provocando la ruptura del privilegio inmunológico del folículo piloso y el desarrollo de la alopecia areata.

Existe un polimorfismo en el exón que codifica para la porción transmembrana de la moléculas MICA basado en diferentes repeticiones de nucleótidos (STR) que no es analizado en los estudios de genoma completo (GWAS), que analizan variaciones de un sólo nucleótido (SNP). Se ha descrito un importante componente genético en la AA, por tanto es de interés analizar si existe algún tipo de asociación entre las variantes STR de MICA y la Alopecia Areata.

Además, MICA se estudiará conjuntamente con HLA-B, cosa que no se hizo en el estudio de la Universidad de Texas. Esto servirá para descartar que cualquier relación que hallemos entre la enfermedad y MICA se deba al ligamiento con HLA-B.

Objetivos

- Estudiar la posible asociación de la Alopecia Areata con los polimorfismos STR de MICA en un estudio casos-control.
- Debido al alto grado de ligamiento entre el gen MICA y el locus HLA-B es necesario establecer si la asociación detectada para un determinado alelo de MICA es independiente o no del polimorfismo de HLA-B. Para ello se requiere realizar el tipaje del locus HLA-B en la misma cohorte de pacientes de AA.

MATERIAL Y MÉTODOS

1 Pacientes

Este estudio, aprobado por el comité ético del Hospital Universitario Virgen de las Nieves (HUVN) y su comisión de investigación, se realizó con muestras de 84 pacientes de alopecia areata; diagnosticados en el HUVN, en Granada, y residentes principalmente del área norte. Dichos pacientes fueron diagnosticados en la consulta de dermatología entre los años 2012 y 2014. Se les informó del proyecto y dieron su consentimiento a participar en él.

El criterio de inclusión fue el diagnóstico de alopecia areata, mientras que el criterio de exclusión fue la negativa a participar en el estudio.

El grupo control consiste en 655 donantes del biobanco de sangre del área sanitaria de Granada norte sanos, también con su correspondiente consentimiento informado.

De los 84 pacientes de alopecia areata, 56 eran mujeres y 28 hombres. De nuestras muestras, tres vinieron identificadas como alopecia totalis (calvicie completa en el cuero cabelludo): dos mujeres y un hombre. Además, seis estaban identificadas como alopecia universalis (carencia de pelo en todo el cuerpo): cuatro mujeres y dos hombres. En los tres casos, la proporción es exactamente de dos mujeres por cada hombre.

Veinte de las muestras llegaron sin información sobre la variante de alopecia, dato que no pudimos rescatar posteriormente. De estas 20, 7 eran hombres y 13 mujeres. 9 muestras vinieron etiquetadas como de presentación ofiásica, de las cuales solo una pertenecía a un varón. El resto presentaba la variante parcheada.

La información sobre localización de la enfermedad también estuvo limitada, con 30 pacientes sin este dato. De los pacientes sin alopecia total ni universal, 7 tenían los parches localizados en la barba, 2 en la barba y el cuero cabelludo, una de las pacientes de la variante parcheada tenía afectación en las cejas además de distintas zonas del cráneo; y una de las que presentaban ofiasis tenía afectación en las cejas y el pubis. El resto tiene descrita solo afectación en el cuero cabelludo.

Los pocos casos de variantes distintas a la parcheada y los muchos casos que nos llegaron sin información sobre la variante de alopecia sufrida nos impidieron realizar un estudio diferenciado por variantes, por lo que solo se puede tener en cuenta la presencia o no de alopecia areata.

20 pacientes nos llegaron sin información sobre su edad. Las edades del resto siguen una distribución normal, según el test de Kolmogorov-Smirnov, tanto en conjunto como tomando a ambos sexos por separado, con un rango de entre 8 y 80 años. Además, con una ANOVA determinamos que las edades medias de los pacientes masculinos y femeninos son iguales.

2 Extracción de ADN y cuantificación

A la sangre, conservada en anticoagulante EDTA, de pacientes y controles se le extrajo el ADN usando el *BioRobot GenoVision M-48* (QUIAGEN, Hilden, Germany) y el kit de extracción de ADN *MagAttract DNA Blood Mini M48* (QUIAGEN, Hilden, Germany).

El fundamento de esta extracción se basa en bolitas de hierro magnéticas recubiertas de sílice, con capacidad de unirse químicamente al ADN en presencia de un agente caotrópico. Gracias a esta unión y a un separador magnético, el material genético se separa del resto de componentes celulares.

El lavado se realiza primero en dos pasos con diferentes tampones de lavado, que aumentan la pureza del ADN que hemos extraído y eliminan contaminantes residuales. Un tercer lavado con agua purifica aún más la muestra.

El ADN purificado se centrifuga un minuto a máxima velocidad para eliminar bolitas magnéticas residuales, que pueden afectar la lectura de la absorbancia. Estas forman un pellet fácil de descartar.

La cuantificación se realiza sobre ADN eluido en 200 μ l de agua destilada libre de RNAsas. El instrumental usado es *NanoDrop 2000c* (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), en el que se mide la absorbancia a una longitud de onda de 260 nm. Una absorbancia de 1 equivale a 50 μ g/ml de

ADN, y las lecturas se consideran precisas si su valor se encuentra entre 0.1 y 1.

Para calcular la pureza del ADN se divide el valor de la absorbancia a 260 nm entre el de la absorbancia a 280 nm. El valor de esta relación en el ADN puro está en torno a 1.7-1.9. Cuando la muestra no cumplió con esta condición, se repitió la extracción de ADN.

3 Estudio de microsatélites de MICA

3.1 PCR

Se amplificó la región transmembrana de MICA en nuestros pacientes mediante una PCR. A partir del ADN genómico extraído en el paso anterior, se usaron cebadores de secuencia 5'-CCTTTTTTTCAGGGAAAGTGC-3 (forward) y 5'-CCTTACCATCTCCAGAACTGC-3' (reverse), para dar un fragmento de una longitud de entre 179 pb (para el alelo MICA-A4, con 4 repeticiones del triplete CGT) y 194 pb (para A9, con 9 repeticiones).

Los reactivos usados para la PCR y sus cantidades fueron:

- 2 µl de ADN purificado con concentración entre 50 y 100 ng/µl
- 4.5 µl de agua destilada libre de RNAsas
- 7.5 µl de *AmpliTaq Gold 360 Master Mix* de Applied Biosystems
- 0.3 µl de cebador forward y otros 0.3 µl de cebador reverse, suministrados por Applied Biosystems

Las condiciones de PCR fueron

1. Un paso inicial de desnaturalización de 7 minutos a 95°C
2. Un paso de desnaturalización de 1 minuto a 95°C
3. Un paso de unión de cebadores de 1 minuto a 59°C
4. Un paso de amplificación de 1 minuto y 40 segundos a 72°C
5. Un paso final de 10 minutos a 72°C
6. Pausar a 4°C

Los pasos de 2 a 4 se repiten un total de 36 veces cíclicamente.

El termociclador usado para la PCR fue el modelo *GeneAmp PCR System 9700* de Applied Biosystems.



Figura 22: Termociclador GeneAmp PCR System 9700..

3.2 Análisis de Fragmentos

Una vez terminada la PCR, se prepara la muestra para el secuenciador. Para ello, se toman 2 μl del amplificado en otro tubo, añadiéndole 9.25 μl de formamida y 0.25 μl de *Liz500*, que es el estándar de tamaño (de 500 pb marcado en naranja-LIZ).



Figura 23: Secuenciador ABI Prism 3130 XL Genetic Analyzer.

El secuenciador usado es un *ABI Prism 3130 XL Genetic Analyzer* de Applied Biosystems, con un software *GeneMapper 4.0* de Applied Biosystems para determinar el tamaño en nucleótidos de los fragmentos obtenidos. La metodología consiste en una electroforesis capilar (con 16 capilares) a través de un polímero *POP-7* de Applied Biosystems, que sirve de matriz de separación.

4 Tipaje de HLA

4.1 PCR

Los distintos loci de HLA estudiados (HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DR y HLA-DQ en este caso) se amplificaron para su tipaje por PCR a partir del ADN extraído en el paso 1. El objetivo es tener unos 80 ng de ADN por muestra, que dependiendo de la concentración obtenida serán aproximadamente entre 2 y 3 μl .

Al ADN se añaden 6 ml de primer mix, específico del locus a amplificar; 0.20 ml de *GoTaq Hot Start Polymerase M500B* de Promega, y agua sin nucleasas hasta completar un volumen de 20 μl .

Las condiciones de la PCR fueron las siguientes:

1. Un ciclo de 3 minutos a 95°C
2. Un paso de desnaturalización a 95°C de 15 segundos
3. Un paso de unión de cebadores a 60°C de 30 segundos
4. Un paso de elongación a 72°C de 30 segundos
5. Los pasos 2-4 se repiten en un total de 12 ciclos
6. Un paso de desnaturalización a 95°C de 10 segundos
7. Un paso de unión de cebadores a 63°C de 30 segundos
8. Un paso de elongación a 72°C de 30 segundos
9. Los pasos 6-8 se repiten en un total de 28 ciclos
10. Un ciclo de elongación adicional a 72°C de 2 minutos
11. Dejar en reposo a 4°C

4.2 SSO

El tipaje se realizó mediante oligonucleótidos específicos de secuencia (*Sequence Specific Oligonucleotide* o SSO) con el kit de Immunocor *LIFECODES HLA-SSO typing kit*.

En primer lugar se hibridaron 2.5 µl del amplificado obtenido en la PCR con 7.5 µl de la mezcla de bioesferas. Estas están marcadas con fluorescencia, emitiendo una señal específica para cada uno de los loci. La hibridación se hace en el termociclador, con las siguientes condiciones:

1. 5 minutos de desnaturalización a 95°C
2. 30 minutos de unión a 47°C
3. 10 minutos a 56°C

A la mezcla hibridada se añadió estreptavidina diluida (0.4 µl en 100 µl de solución de dilución), leyendo de inmediato los resultados en la máquina de *Luminex*. Para interpretar los resultados usamos el programa de Immunocor *Match It! DNA v1.1*.



Figura 24: Equipo de Luminex.

5 Análisis estadístico

Se obtuvieron las frecuencias alélicas y genotípicas por conteo directo. No se tuvieron en cuenta alelos (tanto de HLA como de MICA) cuya frecuencia en la población control fuera inferior al 1% para limitarnos a datos con significancia clínica y simplificar el estudio.

5.1 Descripción de la cohorte

Se intentó clasificar a los pacientes según su sexo, edad y la variante de alopecia areata presentada (parcheada, ofiásica, total o universal). Desafortunadamente, no todas las muestras llegaron con esa información y las pocas muestras con variante total, universal y ofiásica eran insuficientes para realizar un estudio estadístico por variantes clínicas.

5.2 Estudio caso-control

Se realizó un estudio de asociación de enfermedad mediante un test χ^2 de Pearson. Ello requiere una tabla 2x2, y permite calcular *Odds Ratio* (OR) e *intervalo de confianza* (IC). En una de las dimensiones de la tabla se enfrentan enfermos y controles.

En la otra dimensión, en el caso de genes bialélicos se enfrentarían entre sí; pero tanto *HLA-B* como *MICA* son genes polimórficos, de modo que se realizaron diferentes cálculos para cada alelo (o genotipo, en los estudios

correspondientes): en cada uno de ellos, la tabla correspondiente enfrentaba la presencia del alelo de estudio y su ausencia.

	Pacientes	Controles
Presencia del alelo	a	b
Ausencia del alelo	c	d

Esta conversión permite calcular tanto OR como IC como si se tratara de un locus bialélico. Para referencia del OR, mientras que para dos únicos alelos se usaría como referencia el más frecuente, usamos el alelo de estudio de cada caso.

El test χ^2 realiza una comparación entre frecuencias observadas y esperadas, en el que se espera que multiplicar ambas dimensiones de la tabla dé como resultado el número total de casos a estudio en caso de haber distribución al azar. De ser así, la siguiente fórmula daría como resultado aproximadamente 1:

$$\frac{(a + b)(a + c)}{a + b + c + d}$$

En el caso de que la presencia del alelo de estudio (a+b) influya sobre la probabilidad de tener la enfermedad (a+c), el resultado distará de 1.

Un requisito adicional para poder realizar el test χ^2 es que se cumpla la *regla de Cochran*: Es decir, que la frecuencia esperada sea superior a 5 al menos en el 80% de las celdas. Cuando esto ocurra habrá que usar como alternativa el *test exacto de Fisher* (en nuestro caso) u otro similar.

5.3 Equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW)

El *equilibrio de Hardy-Weinberg* se basa en el teorema que, en 1908, formularon independientemente el matemático británico Godfrey H. Hardy y el físico alemán Wilhelm Weinberg. Según este teorema, las frecuencias alélicas y genotípicas de una población tienden a mantenerse constantes en una población en la que solo estén actuando la segregación mendeliana y la

recombinación de los alelos [171]. En otras palabras, una población está en equilibrio de Hardy-Weinberg si se cumplen los siguientes requisitos:

- Sea de tamaño lo suficientemente grande para evitar el efecto de la *deriva genética* (fluctuaciones aleatorias en las frecuencias alélicas entre generaciones en poblaciones pequeñas).
- No haya un flujo genético causado por migración.
- No haya mutaciones que puedan modificar el acervo genético de la población.
- Se dé *panmixia* o apareamiento aleatorio, sin grupos que tiendan a aparearse entre sí.
- No actúe la selección natural.

El que una población esté o no en equilibrio de ligamiento se determina estudiando las frecuencias genotípicas con un test χ^2 de Pearson, comparando las frecuencias observadas con las esperadas y tomando como grados de libertad el número de genotipos menos el número de alelos. Si algún genotipo tiene una frecuencia de 0 casos, se usa el *Test exacto de Levene-Haldane* o la *Prueba de Razón de verosimilitud*, que es la que usamos en este caso concreto. Se ha elegido por tener solo en cuenta los datos observados, y su verosimilitud es proporcional a la probabilidad teórica de obtener el resultado obtenido.

De no estar la población en equilibrio de Hardy-Weinberg, se deben revisar las características de la población para asegurarse de que no hay endogamia ni sujetos que procedan (ellos o sus antepasados cercanos) del extranjero. También sirve como control de calidad, ya que una posible causa de que no se halle equilibrio en la muestra es el haber cometido algún fallo en el genotipado.

5.4 Desequilibrio de ligamiento

Entre genes como *HLA-B* y *MICA*, que están a corta distancia en el cromosoma, normalmente existe un desequilibrio de ligamiento (LD, del inglés *Linkage Disequilibrium*). Cuando esto ocurre, sus alelos no se segregan independientemente, teniendo el genotipo resultante una frecuencia distinta a la esperada en genes que se asocian al azar. El valor de este desequilibrio (D) se puede calcular como la diferencia entre la frecuencia observada del genotipo

en el que ambos alelos están presentes (A1B1) menos la frecuencia esperada de dicho genotipo si ambos genes (A y B) segregan independientemente, como muestra esta ecuación:

$$D = p(A1B1) - p(A1)p(B1)$$

Otro factor a tener en cuenta es que el valor de D, en esta ecuación, depende de las frecuencias alélicas. Por esta razón se estandariza dividiendo entre el valor máximo posible que puede dar; obteniendo el estadístico D', que usaremos en su lugar.

Una alternativa es utilizar en su lugar el coeficiente de correlación (r^2). Aunque este también da valores entre 0 y 1, es más restrictivo; aunque lo afecta menos el tamaño muestral. De este modo, si r^2 es igual a 1 significa que hay un ligamiento completo, mientras que D' puede dar 1 aunque no haya ligamiento si en una de las casillas de la tabla de 2x2 nos encontramos un valor de 0.

Dado que solo disponemos de información sobre el genotipo y desconocemos la fase gamética, se debe usar el algoritmo EM (Esperanza-Maximización) para calcular las frecuencias haplotípicas esperadas, siempre que la población esté en equilibrio de Hardy-Weinberg.

Ante la imposibilidad de obtener un árbol genealógico genético de cada paciente, las fases gaméticas se calculan con el *algoritmo ELB* (Excoffier-Laval-Balding) [172], lo que nos permitiría calcular unos valores teóricos para D, D' y r^2 .

Tras obtener valores para las D, D' y r^2 esperadas y mediante el test de *razón de verosimilitudes*, se comparan las frecuencias haplotípicas calculadas por el algoritmo EM con las obtenidas multiplicando las frecuencias alélicas. Si el p-valor resultante en la razón de verosimilitudes es inferior a 0.05, se considera que hay desequilibrio de ligamiento.

5.5 Corrección de Bonferroni

En el estudio estadístico se define un error de tipo I (o α) como la probabilidad de obtener falsos positivos por rechazar la hipótesis nula siendo

cierta, y tipo II (o β) a la probabilidad de tener falsos negativos por aceptar la hipótesis nula siendo falsa. Sus valores los define el investigador según los riesgos que quiera asumir, y normalmente se considera apropiado un valor de α que sea inferior a 0.05 en estudios de asociación de polimorfismos genéticos con enfermedad.

Al realizar comparaciones múltiples está el problema añadido de que, al realizar varias comprobaciones individuales, aumenta la probabilidad de cometer al menos un error. Así, si se hacen n comparaciones con un α de 0.05, la probabilidad de no cometer error individualmente es de 0.95, pero en total es de $(0.95)^n$, más baja de lo que en principio se espera aceptar. Para corregir este problema existe la *corrección de Bonferroni* (basada en el principio descrito por el matemático italiano Carlo Bonferroni y desarrollado para su aplicación a intervalos de confianza por la matemática estadounidense Olive Jean Dunn). Usando esta corrección se usa un valor de significación corregido de α/n , y el p-valor debe estar por debajo de este límite.

Hecho esto, el nivel de significación global del experimento no varía, sino que sigue siendo α . La potencia estadística, por otra parte, se reduce, aumentando la probabilidad de obtener falsos negativos. Esta es una de las críticas que se hacen a esta aproximación, así como la dependencia del número de test realizados. Un trabajo en el que se estudien muchos más alelos de un gen que otro, por ejemplo, tiene muchas menos probabilidades de hallar resultados significativos que un estudio de una selección de alelos más pequeña aunque se obtengan los mismos resultados.

La corrección de Bonferroni se aplica en este trabajo, al consistir principalmente en comparaciones múltiples. En este caso, mediante el *método de la desigualdad de Bonferroni*, en el que en vez de dividir α/n se multiplica $n(\text{p-valor})$ para mantener α constante entre comparaciones.

5.6 Paquetes estadísticos utilizados

Se usaron los siguientes programas informáticos para el estudio estadístico:

- Para la creación de bases de datos usamos Microsoft Office Excel 2007, Microsoft Office Access 2013 y Statistical Package for the Social Sciences v.15 (SPSS Inc. Chicago, IL, USA), según los requerimientos del paquete estadístico.
- Para el estudio descriptivo de los datos (análisis de frecuencias o tablas de contingencia), además de estudios de regresión logística, test de normalidad o pruebas no paramétricas usamos el SPSS v.15.
- Para facilitar la construcción de tablas de contingencia y calcular OR e IC empleamos el programa para análisis epidemiológico de datos tabulados Epidat v3.1.
- Para analizar el EHW usamos el paquete estadístico PopGene v1.32 (University of Alberta, Canada).
- Elegimos el programa Arlequín v.3.1 para calcular haplotipos usando un algoritmo para datos genotípicos multilocus con fase gamética desconocida, estimación de fases gaméticas y el LD.

RESULTADOS

1 Asociación de alopecia areata y MICA

1.1 Alelos de MICA y alopecia areata

En el test de χ^2 entre alelos de MICA y alopecia areata se obtuvieron los resultados mostrados en la tabla 1. El alelo más frecuente en casos y controles fue MICA*A6, siendo también el que se mostró con frecuencia más elevada en los pacientes respecto a los controles, aunque no alcanzó nivel de significación.

MICA*A4, *A5 y *A5.1, por su parte, mostraron una frecuencia casi idéntica en casos y controles, siendo MICA*A5.1 el más frecuente

Sí lo hizo MICA*A9, que se mostró con menor frecuencia en los pacientes (11 casos, un 6.5%) que en los controles (170, un 13.8%). El p-valor original es de 0.009, pero se tuvo que aplicar la corrección de Bonferroni para dar un p-valor convertido de 0.045; el cual se mantuvo por debajo de 0.05 (con un Odds-Ratio de 0.439, que se halla dentro del intervalo de confianza al 95% de 0.233 a 0.825), lo que consideramos una evidencia suficiente para afirmar que MICA*A9 tiene un efecto protector frente a alopecia areata.

Alelo	Controles	AA	p-valor	p ^c	OR (IC)
	n(%)	n(%)			
MICA*A4	193 (15.6)	24 (14.3)	0.649		
MICA*A5	134 (10.9)	20 (11.9)	0.684		
MICA*A5.1	314 (25.4)	44 (26.2)	0.835		
MICA*A6	423 (34.3)	69 (41.1)	0.084		
MICA*A9	170 (13.8)	11 (6.5)	0.009	0.045	0.439 (0.233-0.825)

Tabla 1: Contingencia entre alelos de MICA y alopecia areata. p^c: p-valor convertido. OR: odds ratio. IC: Intervalo de confianza. En amarillo, el resultado significativo tras la corrección de Bonferroni (multiplicando el p-valor por 5).

1.2 Genotipos de MICA y alopecia areata

Además de estudiar los alelos individuales, se compararon también los genotipos para ver su contingencia con alopecia areata. Estos resultados se muestran en la tabla 2. En algunos genotipos, al haber combinaciones con menos de 5 casos en las tablas de contingencia, no se pudo calcular la χ^2 y se realizó en su lugar el test exacto de Fisher.

En esta comparación no se halló relación alguna entre genotipos y la enfermedad, mostrando frecuencias similares a las esperadas en función de las

frecuencias alélicas. Solo el genotipo *MICA**A5/A5.1, aumentado de un 3.6% (22 casos) en controles a un 9.5% (8 casos) en pacientes presentó un p-valor inferior a 0.05, pero la significación estadística se pierde al aplicar la corrección de Bonferroni (de 0.019 pasa a 0.285).

Algunos genotipos (*MICA**A4/A5, *MICA**A5/A5 y *MICA**A9/A9) no aparecen en los pacientes en absoluto, pero al ser su frecuencia baja en los controles también no llegan a alcanzar un nivel de significación suficiente.

Genotipo	Controles	AA	p-valor	p ^c
	n(%)	n(%)		
<i>MICA</i> *A4/A4	12 (1.9)	3 (3.6)	0.408*	
<i>MICA</i> *A4/A5	18 (2.9)	0	0.151*	
<i>MICA</i> *A4/A5.1	58 (9.4)	5 (6)	0.300	
<i>MICA</i> *A4/A6	67 (10.9)	10 (11.9)	0.774	
<i>MICA</i> *A4/A9	26 (4.2)	3 (3.6)	1*	
<i>MICA</i> *A5/A5	14 (2.3)	0	0.394*	
<i>MICA</i> *A5/A5.1	22 (3.6)	8 (9.5)	0.019*	0.285
<i>MICA</i> *A5/A6	43 (7)	10 (11.9)	0.108	
<i>MICA</i> *A5/A9	23 (3.7)	2 (2.4)	0.757	
<i>MICA</i> *A5.1/A5.1	43 (7)	4 (4.8)	0.448	
<i>MICA</i> *A5.1/A6	107 (17.3)	20 (23.8)	0.149	
<i>MICA</i> *A5.1/A9	41 (6.6)	3 (3.6)	0.276	
<i>MICA</i> *A6/A6	77 (12.5)	13 (15.5)	0.641	
<i>MICA</i> *A6/A9	52 (8.4)	3 (3.6)	0.120	
<i>MICA</i> *A9/A9	14 (2.3)	0	0.394*	

Tabla 2: Genotipos de *MICA* y alopecia areata. pc: p-valor convertido (multiplicado por 15). Asterisco: Se realizó el test exacto de Fisher en lugar de χ^2 al haber pocos casos en una combinación de la tabla de contingencia.

2 Ligamiento de *HLA-B* con *MICA* y alopecia areata

Dado el fuerte desequilibrio de ligamiento descrito entre los loci *MICA* y *HLA-B*, se realizaron un estudio de ligamiento entre ellos y un estudio de contingencia de *HLA-B* con alopecia areata en paralelo para evaluar si los resultados obtenidos para *MICA* podrían ser debidos a la interferencia de *HLA-B*.

2.1 *HLA-B* y alopecia areata

Los resultados de los test χ^2 entre los alelos de *HLA-B* y alopecia areata se muestran en la tabla 3. Al igual que en el caso de los genotipos *MICA*, hubo que realizar un test exacto de Fisher a algunas muestras al haber menos de 5 casos en ciertas combinaciones de las tablas de contingencia.

El alelo *HLA-B14* es significativamente más frecuente en nuestros pacientes (19 casos, siendo un 11.7%) que en los controles (67 casos, siendo un 5.4%), conservándose el nivel de significación tras aplicar la corrección de Bonferroni (pasando de un p-valor de 0.002 a 0.042 con un Odds-Ratio de 2.314; dentro del intervalo de confianza al 95% de 1.351 a 3.964). *HLA-B38*, por otra parte, aparentemente presentaba significación estadística como alelo protector (presentando 0 casos frente a los 31 de los controles, que suponían un 2.5%), pero esta no se conservó tras la corrección, pasando la p de 0.042 a 0.882. Parecido ocurrió con *HLA-B45* y *HLA-B58*, que no se encontraban presentes en ningún caso de alopecia areata; pero en estos casos su frecuencia era tan baja en controles también (20 casos y 16 respectivamente; o 1.6% y 1.3%) que no resultaron significativos desde el primer momento.

Alelo	Control	AA	p	p ^c	OR (IC 95%)
	n (%)	n (%)			
07	121 (9.8)	15 (9.3)	0.826		
08	62 (5.0)	11 (6.8)	0.343		
13	26 (2.1)	1 (0.6)	0.356*		
14	67 (5.4)	19 (11.7)	0.002	0.042	2.314 (1.351-3.964)
15	62 (5.0)	7 (4.3)	0.698		
18	129 (10.5)	10 (6.2)	0.087		
27	43 (3.5)	8 (4.9)	0.354		
35	126 (10.2)	14 (8.6)	0.532		
37	13 (1.1)	2 (1.2)	0.690*		
38	31 (2.5)	0	0.042*	0.882	
39	17 (1.4)	1 (0.6)	0.712		
40	37 (3.0)	5 (3.1)	1*		
41	15 (1.5)	2 (1.2)	1*		
44	190 (15.4)	29 (17.9)	0.410		
45	20 (1.6)	0	0.156*		
49	31 (2.5)	7 (4.3)	0.195*		
50	39 (3.2)	9 (5.6)	0.116		
51	113 (9.2)	10 (6.2)	0.208		
52	19 (1.5)	3 (1.9)	0.735*		
57	26 (2.1)	3 (1.9)	1*		
58	16 (1.3)	0	0.242		

Tabla 3: Alelos de HLA-B y alopecia areata. pc: p-valor convertido. Asterisco: Se realizó el test exacto de Fisher en lugar de χ^2 al haber pocos casos en una combinación de la tabla de contingencia. OR: odds ratio. IC: Intervalo de confianza. En amarillo, las filas correspondientes a alelos con los que se ha hallado desequilibrio de ligamiento. En negrita, el alelo que conserva la significación tras la corrección de Bonferroni multiplicando p por 21.

2.2 HLA-B y MICA

Para cada uno de los alelos de *MICA* se realizó un estudio de ligamiento con *HLA-B* (ver Tabla 4, Tabla 5, Tabla 6, Tabla 7 y Tabla 8). Se obtuvieron varias asociaciones en principio al tener en cuenta las pruebas individuales, pero siendo estrictos, al haber comparado 20 alelos *HLA-B* con 5 alelos *MICA*, al aplicar la corrección de Bonferroni el p-valor debe ser igual o menor a 5×10^{-4} para ser significativo, lo que reduce el número de ligamientos significativos para algunos alelos, especialmente en el caso de *MICA**A6, en el que pasamos de tener un ligamiento significativo con más de la mitad de los alelos *HLA-B* a no tener ligamiento significativo alguno.

MICA*A4						
Locus	Observados	Esperados	Desequilibrio	Estandarizado	χ^2	p-valor
7	2	2.22	-0.0014	0.0002	0.0287	0.8654
8	0	1.63	-0.0101	0.0127	20.524	0.1520
13	0	0.15	-0.0009	0.0011	0.1750	0.6757
14	0	2.81	-0.0174	0.0231	37.434	0.0530
15	0	1.04	-0.0064	0.0079	12.724	0.2593
18	10	1.48	0.0526	0.3783	612.829	0.0000
27	8	1.19	0.0421	0.2987	483.896	0.0000
35	0	2.07	-0.0128	0.0165	26.651	0.1026
37	0	0.30	-0.0018	0.0022	0.3522	0.5529
39	0	0.15	-0.0009	0.0011	0.1750	0.6757
40	1	0.74	0.0016	0.0007	0.1099	0.7402
41	0	0.30	-0.0018	0.0022	0.3522	0.5529
44	0	4.30	-0.0265	0.0379	61.432	0.0132
49	0	1.04	-0.0064	0.0079	12.724	0.2593
50	0	1.33	-0.0082	0.0102	16.573	0.1980
51	0	1.48	-0.0091	0.0114	18.535	0.1734
52	0	0.44	-0.0027	0.0033	0.5316	0.4659
53	0	0.44	-0.0027	0.0033	0.5316	0.4659
55	3	0.44	0.0158	0.1085	175.755	0.0000
57	0	0.44	-0.0027	0.0033	0.5316	0.4659
Total	24					

Tabla 4: Desequilibrios de ligamiento de *MICA**A4. En amarillo, las filas correspondientes a alelos con los que se ha hallado desequilibrio de ligamiento. En negrita, aquellos que conservan la significación tras la corrección de Bonferroni (p-valor inferior a 0.0005).

MICA*A5						
Locus	Observados	Esperados	Desequilibrio	Estandarizado	χ^2	p-valor
7	0	1.67	-0.0103	-10.000	20.663	0.2725
8	0	1.22	-0.0075	-10.000	14.752	0.3538
13	0	0.11	-0.0007	-10.000	0.1258	0.7866
14	6	2.11	0.0240	0.2448	91.300	0.2105
15	6	0.78	0.0322	0.8393	412.279	0.4654
18	0	1.11	-0.0069	-10.000	13.322	0.3782

27	0	0.89	-0.0055	-10.000	10.519	0.4336
35	2	1.56	0.0027	0.0357	0.1564	0.0000
37	1	0.22	0.0048	0.4375	31.008	0.7009
39	1	0.11	0.0055	10.000	80.497	0.7866
40	0	0.56	-0.0034	-10.000	0.6449	0.5398
41	0	0.22	-0.0014	-10.000	0.2531	0.7009
44	0	3.22	-0.0199	-10.000	44.154	0.1087
49	0	0.78	-0.0048	-10.000	0.9145	0.4654
50	1	1.00	0.0000	0.0000	0.0000	0.4047
51	1	1.11	-0.0007	-0.1000	0.0133	0.3782
52	0	0.33	-0.0021	-10.000	0.3821	0.6370
53	0	0.33	-0.0021	-10.000	0.3821	0.0000
55	0	0.33	-0.0021	-10.000	0.3821	0.6370
57	0	0.33	-0.0021	-10.000	0.3821	0.0000
Total	18					

Tabla 5: Desequilibrios de ligamiento de MICA*A5. En amarillo, las filas correspondientes a alelos con los que se ha hallado desequilibrio de ligamiento. En negrita, aquellos que conservan la significación tras la corrección de Bonferroni (p-valor inferior a 0.0005).

MICA*A5.1						
Locus	Observados	Esperados	Desequilibrio	Estandarizado	χ^2	p-valor
7	12	4.07	0.0489	0.1440	233.293	0.0000
8	11	2.99	0.0495	0.1954	316.490	0.0000
13	1	0.27	0.0045	0.0167	26.985	0.1004
14	0	5.16	-0.0319	0.0495	80.261	0.0046
15	0	1.90	-0.0117	0.0168	27.280	0.0986
18	0	2.72	-0.0168	0.0245	39.741	0.0462
27	0	2.17	-0.0134	0.0194	31.380	0.0765
35	4	3.80	0.0012	0.0001	0.0154	0.9012
37	0	0.54	-0.0034	0.0047	0.7551	0.3849
39	0	0.27	-0.0017	0.0023	0.3752	0.5402
40	2	1.36	0.0040	0.0027	0.4299	0.5120
41	0	0.54	-0.0034	0.0047	0.7551	0.3849
44	12	7.88	0.0255	0.0223	36.098	0.0574
49	0	1.90	-0.0117	0.0168	27.280	0.0986
50	1	2.44	-0.0089	0.0077	12.407	0.2653
51	0	2.72	-0.0168	0.0245	39.741	0.0462
52	0	0.81	-0.0050	0.0070	11.398	0.2857
53	0	0.81	-0.0050	0.0070	11.398	0.2857
55	0	0.81	-0.0050	0.0070	11.398	0.2857
57	1	0.81	0.0011	0.0004	0.0589	0.8083
Total	44					

Tabla 6: Desequilibrios de ligamiento de MICA*A5.1. En amarillo, las filas correspondientes a alelos con los que se ha hallado desequilibrio de ligamiento. En negrita, aquellos que conservan la significación tras la corrección de Bonferroni (p-valor inferior a 0.0005).

MICA*A6						
Locus	Observados	Esperados	Desequilibrio	Estandarizado	C2	p-valor
7	1	6.02	-0.0310	0.0475	77.020	0.0055
8	0	4.41	-0.0272	0.0488	79.081	0.0049

13	0	0.40	-0.0025	0.0042	0.6743	0.4116
14	13	7.62	0.0332	0.0443	71.743	0.0074
15	1	2.81	-0.0112	0.0125	20.330	0.1539
18	0	4.01	-0.0248	0.0441	71.419	0.0075
27	0	3.21	-0.0198	0.0348	56.393	0.0176
35	2	5.62	-0.0223	0.0263	42.583	0.0391
37	1	0.80	0.0012	0.0005	0.0822	0.7743
39	0	0.40	-0.0025	0.0042	0.6743	0.4116
40	2	2.01	-0.0000	0.0000	0.0000	0.9954
41	2	0.80	0.0074	0.0187	30.219	0.0821
44	17	11.64	0.0331	0.0311	50.306	0.0249
49	7	2.81	0.0259	0.0674	109.179	0.0010
50	7	3.61	0.0209	0.0347	56.239	0.0177
51	9	4.01	0.0308	0.0681	110.359	0.0009
52	3	1.20	0.0111	0.0282	45.614	0.0327
53	0	1.20	-0.0074	0.0126	20.482	0.1524
55	0	1.20	-0.0074	0.0126	20.482	0.1524
57	0	1.20	-0.0074	0.0126	20.482	0.1524
Total	65					

Tabla 7: Desequilibrios de ligamiento de MICA*A6. En amarillo, las filas correspondientes a alelos con los que se ha hallado desequilibrio de ligamiento Ninguna de ellas conserva la significación tras la corrección de Bonferroni (p-valor inferior a 0.0005).

MICA*A9						
Locus	Observados	Esperados	Desequilibrio	Estandarizado	C2	p-valor
7	0	1.02	-0.0063	0.0074	12.042	0.2725
8	0	0.75	-0.0046	0.0053	0.8597	0.3538
13	0	0.07	-0.0004	0.0005	0.0733	0.7866
14	0	1.29	-0.0080	0.0097	15.680	0.2105
15	0	0.48	-0.0029	0.0033	0.5330	0.4654
18	0	0.68	-0.0042	0.0048	0.7764	0.3782
27	0	0.54	-0.0034	0.0038	0.6131	0.4336
35	6	0.95	0.0312	0.1944	314.965	0.0000
37	0	0.14	-0.0008	0.0009	0.1475	0.7009
39	0	0.07	-0.0004	0.0005	0.0733	0.7866
40	0	0.34	-0.0021	0.0023	0.3758	0.5398
41	0	0.14	-0.0008	0.0009	0.1475	0.7009
44	0	1.97	-0.0122	0.0159	25.732	0.1087
49	0	0.48	-0.0029	0.0033	0.5330	0.4654
50	0	0.61	-0.0038	0.0043	0.6942	0.4047
51	0	0.68	-0.0042	0.0048	0.7764	0.3782
52	0	0.20	-0.0013	0.0014	0.2227	0.6370
53	3	0.20	0.0173	0.2590	419.588	0.0000
55	0	0.20	-0.0013	0.0014	0.2227	0.6370
57	2	0.20	0.0111	0.1069	173.146	0.0000
Total	11					

Tabla 8: Desequilibrios de ligamiento de MICA*A9. En amarillo, las filas correspondientes a alelos con los que se ha hallado desequilibrio de ligamiento En negrita, aquellos que conservan la significación tras la corrección de Bonferroni (p-valor inferior a 0.0005).

Concretamente, se han buscado ligamientos de los alelos ya relacionados con alopecia areata, por si esta relación pudiera explicarse mediante un ligamiento con otro alelo responsable. Se hallaron equilibrios de ligamiento irrelevantes para nuestro estudio entre *MICA*A4* y *HLA-B18*, *B27* y *B55*; entre *MICA*A5* y *HLA-B35* (desequilibrio positivo) y *HLA-B53* y *B57* (desequilibrio negativo), y *MICA*A5.1* y *HLA-B7* y *B8*.

De entre los alelos de interés, el alelo *MICA*A9* se halla en desequilibrio positivo de ligamiento con *HLA-B35* (6 casos observados frente a los 0.95 esperados), *B53* (3 casos observados frente a los 0.2 esperados) y *B57* (2 casos observados frente a los 0.2 esperados), con un p-valor insignificante en los tres casos; pero ninguno de los cuales se muestra relacionado con la enfermedad, por lo que descartamos que su función protectora se deba a ligamiento con *HLA-B* protector.

HLA-B14, por su parte, muestra un aparente desequilibrio de ligamiento positivo con *MICA*A6* (observados juntos en 13 casos frente a los 7.62 esperados) y negativo con *MICA*A5.1* (presente en 0 casos frente a los 5.16 esperados), pero al aplicar la corrección de Bonferroni no mantiene la significación estadística en ninguno de los dos casos.

DISCUSIÓN

1 Relaciones halladas de *MICA* con alopecia areata

1.1 *MICA**A9

En el caso del gen *MICA*, la única relación estadísticamente significativa que hallamos es la de *MICA**A9 como alelo con función protectora (Tabla 1). Además, como ninguno de los alelos de *HLA-B* ligados con *MICA**A9 tienen efecto sobre la probabilidad de contraer alopecia areata (Tabla 3 y Tabla 8), podemos descartar que este resultado sea producto de un ligamiento con un alelo de *HLA-B* que sea el auténtico responsable del resultado obtenido.

En el estudio de Barahmani et al., sin embargo, no sólo no se halló efecto protector de *MICA**A9 contra alopecia areata, sino que incluso su frecuencia relativa era mayor en pacientes que en controles [155].

La diferencia entre ambos estudios podría deberse a las diferentes poblaciones estudiadas. Lamentablemente, aunque sabemos que nuestra población de estudio era española, carecemos de información sobre la procedencia de la composición étnica del estudio de la universidad tejana. En el sudoeste de estados unidos, incluida Texas, existe una variedad étnica considerable, estando más representados los anglosajones e hispanos, pero existen también numerosos ciudadanos de otras procedencias. No podemos saber, pues, si la procedencia es una, otra o una mezcla heterogénea.

La significación clínica de este alelo se ha visto en otras enfermedades. Un metaanálisis halló asociación de *MICA**A9 con susceptibilidad a psoriasis en asiáticos y a artritis psoriásica en europeos [157]. Otras asociaciones son con carcinoma nasofaríngeo [158] y una variante agravada de la fiebre mediterránea familiar [159]. Además, combinado con el haplotipo de *HLA DQ8DR4*, se asocia a diabetes mellitus de tipo I [160].

Por otra parte, *MICA**A9 muestra efecto protector contra otras enfermedades. Está débilmente asociado con un efecto protector contra artritis reumatoide en asiáticos orientales, aunque no en europeos [161]. En combinación genotípica con *MICA**A5 es un factor protector contra cáncer en poblaciones caucásicas, pero no en asiáticos orientales [162].

De estas asociaciones, son especialmente relevantes las de artritis psoriásica, psoriasis y artritis reumatoide, que son enfermedades autoinmunes al igual que alopecia areata (sin olvidarnos de la fiebre mediterránea familiar, que es autoinflamatoria) y respaldan la importancia de este alelo en procesos de tolerancia y autoinmunidad; si bien es llamativo su efecto de factor de protección en unos casos y de factor de susceptibilidad en otros.

Un factor a tener en cuenta es en hecho de que el aminoácido 129 de la proteína codificada por *MICA*A9* es una metionina, y no una valina [151]. Esto conlleva un aumento de afinidad por NKG2D [151], lo que es fácil de asociar a los estudios en los que causa susceptibilidad a enfermedades autoinmunes y protección contra cáncer, pero no tanto a los casos de protección contra enfermedades autoinmunes. En cualquier caso, se desconocen los mecanismos exactos por los que este polimorfismo afecta a la probabilidad de contraer dichas enfermedades.

1.2 *MICA*A6*

Aunque no hemos hallado asociación significativa de este alelo con alopecia areata (Tabla 1), el hecho de que Barahmani sí lo hiciera [155] merece un comentario más extenso.

De los alelos estudiados, *MICA*A6* es el que muestra un mayor aumento en la frecuencia relativa en pacientes respecto a los controles. Aunque no alcanza significación estadística, se queda lo bastante cerca como para considerarlo interesante tras la asociación hallada en Texas. ¿Por qué esta frecuencia aumentada en pacientes de alopecia areata?

Una posible respuesta está en el estudio de asociación de *MICA*A6* con *HLA-B14*, que sí está asociado con alopecia areata en este estudio (Tabla 3). De nuevo nos encontramos una asociación entre dichos alelos que no alcanza la significación estadística (Tabla 7), pero en este caso el p-valor da originalmente un valor significativo (0.0074). Solo con la corrección de Bonferroni pierde la significación, ya que el estudio de asociaciones se compone de 100 comparaciones individuales, lo que nos obliga a tomar como no significativo todo p-valor por encima de 0.0005.

Como la corrección de Bonferroni se considera en general conservadora, aunque aceptemos que esta asociación no es estadísticamente significativa, podemos considerar el resultado sugerente. Por lo tanto, como la publicación tejana no incluía estudio de ligamiento con *HLA-B*, esto lleva a plantearse la duda sobre sus resultados; duda que se podría aclarar con un estudio de ligamiento con *HLA-B* como el que se ha realizado aquí, realizado a posteriori.

Considerando como posible la asociación de *MICA**A6 con alopecia areata en otras poblaciones aunque no esté asociada en Granada, es interesante notar que este alelo esté asociado con la enfermedad de Behçet [173] y, en chinos han, con artritis reumatoide [174].

1.3 Genotipos de *MICA*

Al estudiar la relación de los distintos genotipos de *MICA* con alopecia areata, queda de especial manifiesto el efecto del reducido tamaño muestral al que hemos tenido acceso.

Aunque ningún resultado del estudio genotípico resultó significativo (Tabla 2), llama la atención que todos los genotipos que incluyen *MICA**A9 muestran una frecuencia relativa menor. Si bien esto se explica por la presencia del alelo en cuestión, del que sí hemos probado un efecto protector (Tabla 1), es razonable preguntarnos si la homocigosidad para dicho alelo no puede representar una protección aún mayor. En efecto, ninguno de los pacientes presenta un genotipo homocigoto para *MICA**A9.

Obviamente, no esperaríamos un resultado diferente si este genotipo tuviera una función protectora (es imposible hallar menos de 0 casos en la muestra), lo que nos hace pensar que sería un error interpretar este resultado como una ausencia de dicha función, sino como una significación insuficiente a causa del limitado tamaño muestral.

Este mismo razonamiento es aplicable a los homocigotos para *MICA**A5 y para el genotipo *MICA**A4/*MICA**A5, que también están totalmente ausentes en nuestros pacientes (Tabla 2), aunque ninguno de los alelos que los conforman muestra la menor tendencia protectora contra la enfermedad y, de

hecho, *MICA**A5 se encuentra con una frecuencia relativa ligeramente mayor en pacientes que en controles (Tabla 1).

No hay que caer en la tentación, sin embargo, de asumir que al aumentar el tamaño muestral obtendríamos este mismo resultado con mejor significación estadística. Bien pudiera ser que, con una población base más sólida, encontrásemos que este resultado aparente deja de sugerirse.

Algo similar ocurre con *MICA**A6, para el cual todos los genotipos que lo incluyen se muestran con mayor frecuencia en pacientes que en controles (excepto en el genotipo *MICA**A6/*MICA**A9), pero también sin significación estadística.

2 Relaciones de *HLA-B* con alopecia areata

2.1 *HLA-B14*

HLA-B14 es el único alelo en el que hemos encontrado una asociación significativa de susceptibilidad a alopecia areata (Tabla 3), y no se ha hallado desequilibrio de ligamiento significativo con un alelo de *MICA* que muestre este mismo resultado. Aunque el objetivo principal de este estudio es buscar la relación de *MICA* con la enfermedad y *HLA-B* se estudia sobre todo para descartar que nuestros hallazgos con el otro gen se deban a desequilibrios de ligamiento, este hallazgo no ha sido descrito antes, por lo que resulta interesante profundizar en este tema.

HLA-B14 se ha descrito relacionado con susceptibilidad a espondilitis anquilosante [175, 176], y también a enfermedad de Parkinson postencefalítica en judíos americanos [177], así como a anemia aplásica pancitopénica grave en niños [178]. Todas ellas son enfermedades autoinmunes, pero también se ha descrito un efecto protector contra la enfermedad de Graves desencadenada por el estrés [179]. Aparte de los desórdenes autoinmunes, también se ha hallado un efecto protector de *HLA-B14* contra carcinoma nasofaríngeo [180].

Como se ha visto antes, *HLA-B14* se mostraba una frecuencia menor junto a *MICA**A5.1 y mayor junto a *MICA**A6 (Tabla 6 y Tabla 7), aunque en

ambos casos pierde la significación al aplicar la corrección de Bonferroni correspondiente a las 100 comparaciones. Curiosamente, son estos alelos los que Barahmani halló relacionados con alopecia areata en conjunto (*MICA**A6) y con la variante parcheada (*MICA**A5.1) [155]. Sin ánimo de repetir lo ya comentado sobre la posible repercusión de un desequilibrio de ligamiento en dicho estudio, cabe destacar que el aparente desequilibrio de ligamiento pondría en duda no unode sus resultados, sino los correspondientes a ambos alelos.

2.2 HLA-B38, B45 y B58

Con estos alelos de *HLA-B* ocurre algo similar a lo que nos encontramos con el genotipo homocigoto para *MICA**A9: No los encontramos en ninguno de nuestros pacientes (Tabla 3), pero el estudio no alcanza un nivel de significación apropiado (con *B38* se acerca, pero deja de ser significativo al aplicar la corrección de Bonferroni) para asegurar que tengan una función protectora, aunque su ausencia en pacientes es el resultado más aproximado posible a la hipótesis de que sí tienen dicha función.

3 Comparación entre estudios

Como ya se ha visto, el estudiar o no *HLA-B* junto a *MICA* es una herramienta crucial para descartar la influencia del ligamiento entre dos genes que, siendo muy próximos, se han descrito previamente como relacionados con la enfermedad [154].

De este modo, aunque sabemos que el efecto protector que hemos hallado en nuestra población de *MICA**A9 contra alopecia areata no se debe a desequilibrio de ligamiento alguno (Tabla 1, Tabla 3 y Tabla 8), el hecho de que el estudio hecho en Texas no tomara la precaución de estudiar *HLA-B* [155] nos lleva a preguntarnos si las asociaciones que hallaron se pueden deber a *HLA-B* más que a *MICA*.

CONCLUSIONES

- Existe un efecto protector del polimorfismo STR *MICA**A9 contra alopecia areata en la población de estudio, independiente de su ligamiento con *HLA-B35*, *HLA-B53* y *HLA-B57*.
- *HLA-B14* resulta ser un factor de riesgo para la enfermedad, independientemente de cualquier posible vinculación con polimorfismos STR en nuestra serie de pacientes.
- Estos resultados pueden aplicarse a la clínica para definir la población de riesgo de presentar alopecia areata en los familiares de primer grado de los pacientes.

conclusiones

BIBLIOGRAFÍA

1. Murphy, K. and C. Weaver, *Janeway's immunobiology*. 9th edition. ed. 2016, New York, NY: Garland Science/Taylor & Francis Group, LLC. xx, 904 pages.
2. Li, Y. and R.A. Mariuzza, *Structural basis for recognition of cellular and viral ligands by NK cell receptors*. *Front Immunol*, 2014. **5**: p. 123.
3. Abe, Y. and N. Tanaka, *Roles of the Hedgehog Signaling Pathway in Epidermal and Hair Follicle Development, Homeostasis, and Cancer*. *J Dev Biol*, 2017. **5**(4).
4. Broadley, D. and K.J. McElwee, *A "hair-raising" history of alopecia areata*. *Exp Dermatol*, 2020. **29**(3): p. 208-222.
5. Sauvages, *Nosologica Medica*. 1760.
6. Crocker; Radcliffe, H., *Diseases of the skin; their description, pathology, diagnosis, and treatment, with special reference to the skin eruptions of children and an analysis of fifteen thousand cases of skin disease*. 3d ed. 1903, Philadelphia,: P. Blakiston's son & co. 1466 p.
7. Macalpine, I., *Is alopecia areata psychosomatic? A psychiatric study*. *Br J Dermatol*, 1958. **70**(4): p. 117-31.
8. Davis, H., *Epidemic alopecia areata*. *Br J Dermatol*, 1914(26): p. 207-210.
9. Bowen, J., *Two epidemics of alopecia areata in an asylum for girls*. *J of Cutaneous and Genito-Urinary Disease*, 1899(17): p. 399-404.
10. Colcott Fox, T., *On a small epidemic of alopecia areata*. *Br J Dermatol*, 1913(25): p. 51-56.
11. Sabouraud, R., *Sur les origines de la pelade*. *Annales de Dermatologie et de Syphiligraphie*, 1896(3): p. 253-277.
12. Ormsby, O.S. and H. Montgomery, *Diseases of the skin*. 7th ed. 1948, Philadelphia,: Lea & Febiger. 1462 p.
13. Ikeda, T., *Produced alopecia areata based on the focal infection theory and mental motive theory*. *Dermatologica*, 1967. **134**(1): p. 1-11.
14. Kingsbury, *Three cases of alopecia areata associated with ametropia*. *J Cutaneous Disease*, 1909(27): p. 211.
15. Sequeira, *Trans XVII Int Cong Med London*. 1913. p. 142.
16. Joseph, M., *Experimentelle untersuchungen über die ätiologie der alopecia areata*. *Monatshefte für praktische dermatologie*, 1886(5): p. 483-489.
17. Jacquet, L., *Nature et traitement de la pelade - la pelade d'origine dentaire*. *Ann Dermatol et de Syph*, 1902(3): p. 180-190.
18. Decelle, *Bull et Mem. Soc Med de Hop de Paris*, 1909(21): p. 72.
19. Bailly, *L'origine gingivodentaire de la pelade*. 1910, Lyons.
20. Kinnear, J., *Gardiner's handbook of skin diseases*. Fourth Edition ed. 1939, Edinburgh: E&S Livingstone.
21. Sabouraud, R., *Nouvelles recherches sur l'etiologie de la pelade (pelade et menopause)*. *Annales de Dermatologie et de Syphiligraphie*, 1913(5): p. 88-97.
22. Roxburgh, A., *Common skin diseases*. ninth edition ed. 1950, London: HK Lewis & Co. Ltd.
23. Savill A, W.E., *Savill's system of clinical medicine*. eleventh edition ed. 1939, London: Edward Arnold & Co.
24. Adamson, H.G., *Goulstonian lectures on modern views upon the significance of skin eruptions : delivered before the Royal College of*

- Physicians of London. Goulstonian lectures. 1912, London: J. Bale, Sons & Danielsson. 103 p.*
25. Dixon, W.E., *Thallium*. Proc R Soc Med, 1927. **20**(8): p. 1197-200.
 26. Giovannini, S., *Recherches sur l'histologie pathologique de la pelade*. Annales de Dermatologie et de Syphiligraphie. 1891.
 27. Van Scott, E., *Morphologic changes in pilosebaceous units and anagen hairs in alopecia areata*. J Invest Dermatol, 1958(31): p. 35-43.
 28. McElwee, K.J., et al., *What causes alopecia areata?* Exp Dermatol, 2013. **22**(9): p. 609-26.
 29. Mirzoyev, S.A., et al., *Lifetime incidence risk of alopecia areata estimated at 2.1% by Rochester Epidemiology Project, 1990-2009*. J Invest Dermatol, 2014. **134**(4): p. 1141-1142.
 30. Strazzulla, L.C., et al., *Alopecia areata: Disease characteristics, clinical evaluation, and new perspectives on pathogenesis*. J Am Acad Dermatol, 2018. **78**(1): p. 1-12.
 31. Willemsen, R., et al., *Increased history of childhood and lifetime traumatic events among adults with alopecia areata*. J Am Acad Dermatol, 2009. **60**(3): p. 388-93.
 32. Jackow, C., et al., *Alopecia areata and cytomegalovirus infection in twins: genes versus environment?* J Am Acad Dermatol, 1998. **38**(3): p. 418-25.
 33. Kim, H.S. and H.S. Shin, *Alopecia areata associated with abacavir therapy*. Infect Chemother, 2014. **46**(2): p. 103-5.
 34. Geletko, S.M., M. Segarra, and D.J. Mikolich, *Alopecia associated with zidovudine therapy*. Pharmacotherapy, 1996. **16**(1): p. 79-81.
 35. Zhang, X. and K.J. McElwee, *Allergy promotes alopecia areata in a subset of patients*. Exp Dermatol, 2020. **29**(3): p. 239-242.
 36. Rodriguez, T.A., et al., *Concordance rate of alopecia areata in identical twins supports both genetic and environmental factors*. J Am Acad Dermatol, 2010. **62**(3): p. 525-7.
 37. Blaumeiser, B., et al., *Familial aggregation of alopecia areata*. J Am Acad Dermatol, 2006. **54**(4): p. 627-32.
 38. Walker, S.A. and S. Rothman, *Alopecia Areata - a Statistical Study and Consideration of Endocrine Influences*. Journal of Investigative Dermatology, 1950. **14**(6): p. 403-413.
 39. Putterman, E. and L. Castelo-Soccio, *Seasonal patterns in alopecia areata, totalis, and universalis*. J Am Acad Dermatol, 2018. **79**(5): p. 974-975.
 40. Gilhar, A., A. Etzioni, and R. Paus, *Alopecia areata*. N Engl J Med, 2012. **366**(16): p. 1515-25.
 41. Munoz, M.A. and F.M. Camacho, *Sisaipho: a new form of presentation of alopecia areata*. Arch Dermatol, 1996. **132**(10): p. 1255-6.
 42. Saceda-Corralo, D., et al., *Beard alopecia areata: a multicentre review of 55 patients*. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2017. **31**(1): p. 187-192.
 43. Lew, B.L., M.K. Shin, and W.Y. Sim, *Acute diffuse and total alopecia: A new subtype of alopecia areata with a favorable prognosis*. J Am Acad Dermatol, 2009. **60**(1): p. 85-93.
 44. Kasumagic-Halilovic, E. and A. Prohic, *Nail changes in alopecia areata: frequency and clinical presentation*. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2009. **23**(2): p. 240-1.

45. Barahmani, N., M.B. Schabath, and M. Duvic, *History of atopy or autoimmunity increases risk of alopecia areata*. J Am Acad Dermatol, 2009. **61**(4): p. 581-91.
46. Wang, S.J., et al., *Increased risk for type I (insulin-dependent) diabetes in relatives of patients with alopecia areata (AA)*. Am J Med Genet, 1994. **51**(3): p. 234-9.
47. Rencz, F., et al., *Alopecia areata and health-related quality of life: a systematic review and meta-analysis*. Br J Dermatol, 2016. **175**(3): p. 561-71.
48. Alkhalifah, A., et al., *Alopecia areata update: part I. Clinical picture, histopathology, and pathogenesis*. J Am Acad Dermatol, 2010. **62**(2): p. 177-88, quiz 189-90.
49. Safavi, K.H., et al., *Incidence of alopecia areata in Olmsted County, Minnesota, 1975 through 1989*. Mayo Clin Proc, 1995. **70**(7): p. 628-33.
50. Ross, E.K., C. Vincenzi, and A. Tosti, *Videodermoscopy in the evaluation of hair and scalp disorders*. J Am Acad Dermatol, 2006. **55**(5): p. 799-806.
51. Whiting, D.A., *Histopathologic features of alopecia areata: a new look*. Arch Dermatol, 2003. **139**(12): p. 1555-9.
52. Messenger, A.G., et al., *British Association of Dermatologists' guidelines for the management of alopecia areata 2012*. Br J Dermatol, 2012. **166**(5): p. 916-26.
53. Claudy, A.L. and D. Gagnaire, *PUVA treatment of alopecia areata*. Arch Dermatol, 1983. **119**(12): p. 975-8.
54. Ellis, C.N., M.F. Brown, and J.J. Voorhees, *Sulfasalazine for alopecia areata*. J Am Acad Dermatol, 2002. **46**(4): p. 541-4.
55. Phan, K., V. Ramachandran, and D.F. Sebaratnam, *Methotrexate for alopecia areata: A systematic review and meta-analysis*. J Am Acad Dermatol, 2019. **80**(1): p. 120-127.e2.
56. Lai, V.W.Y., et al., *Cyclosporine for moderate-to-severe alopecia areata: A double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial of efficacy and safety*. J Am Acad Dermatol, 2019. **81**(3): p. 694-701.
57. Winter, R.J., F. Kern, and R.M. Blizzard, *Prednisone therapy for alopecia areata. A follow-up report*. Arch Dermatol, 1976. **112**(11): p. 1549-52.
58. Zakaria, W., et al., *308-nm excimer laser therapy in alopecia areata*. J Am Acad Dermatol, 2004. **51**(5): p. 837-8.
59. Talpur, R., et al., *Phase I/II randomized bilateral half-head comparison of topical bexarotene 1% gel for alopecia areata*. J Am Acad Dermatol, 2009. **61**(4): p. 592.e1-9.
60. Trink, A., et al., *A randomized, double-blind, placebo- and active-controlled, half-head study to evaluate the effects of platelet-rich plasma on alopecia areata*. Br J Dermatol, 2013. **169**(3): p. 690-4.
61. Yun, D., N.B. Silverberg, and S.L. Stein, *Alopecia areata treated with hydroxychloroquine: A retrospective study of nine pediatric cases*. Pediatr Dermatol, 2018. **35**(3): p. 361-365.
62. Liu, L.Y., et al., *Tofacitinib for the treatment of severe alopecia areata and variants: A study of 90 patients*. J Am Acad Dermatol, 2017. **76**(1): p. 22-28.

63. Mackay-Wiggan, J., et al., *Oral ruxolitinib induces hair regrowth in patients with moderate-to-severe alopecia areata*. JCI Insight, 2016. **1**(15): p. e89790.
64. Hardy, M.H., *The secret life of the hair follicle*. Trends Genet, 1992. **8**(2): p. 55-61.
65. Schmidt-Ullrich, R. and R. Paus, *Molecular principles of hair follicle induction and morphogenesis*. Bioessays, 2005. **27**(3): p. 247-61.
66. Veltri, A., C. Lang, and W.H. Lien, *Concise Review: Wnt Signaling Pathways in Skin Development and Epidermal Stem Cells*. Stem Cells, 2018. **36**(1): p. 22-35.
67. Xin, T., et al., *Flexible fate determination ensures robust differentiation in the hair follicle*. Nat Cell Biol, 2018. **20**(12): p. 1361-1369.
68. Panteleyev, A.A., *Functional anatomy of the hair follicle: The Secondary Hair Germ*. Exp Dermatol, 2018. **27**(7): p. 701-720.
69. Schneider, M.R., R. Schmidt-Ullrich, and R. Paus, *The hair follicle as a dynamic miniorgan*. Curr Biol, 2009. **19**(3): p. R132-42.
70. Paus, R., *Exploring the "brain-skin connection": Leads and lessons from the hair follicle*. Curr Res Transl Med, 2016. **64**(4): p. 207-214.
71. Paus, R., *A neuroendocrinological perspective on human hair follicle pigmentation*. Pigment Cell Melanoma Res, 2011. **24**(1): p. 89-106.
72. Paus, R., T.C. Theoharides, and P.C. Arck, *Neuroimmunoendocrine circuitry of the 'brain-skin connection'*. Trends in Immunology, 2006. **27**(1): p. 32-39.
73. Theoharides, T.C., et al., *Neuroendocrinology of the skin*. Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders, 2016. **17**(3): p. 287-294.
74. Arck, P., et al., *Is there a 'gut-brain-skin axis'?* Experimental Dermatology, 2010. **19**(5): p. 401-405.
75. Hinde, E., et al., *A practical guide for the study of human and murine sebaceous glands in situ*. Experimental Dermatology, 2013. **22**(10): p. 631-637.
76. Ito, N., et al., *Human hair follicles display a functional equivalent of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and synthesize cortisol*. FASEB Journal, 2005. **19**(10): p. 1332-1334.
77. Ito, N., et al., *Corticotropin-Releasing Hormone Stimulates the In Situ Generation of Mast Cells from Precursors in the Human Hair Follicle Mesenchyme*. Journal of Investigative Dermatology, 2010. **130**(4): p. 995-1004.
78. Ito, T., et al., *Collapse and Restoration of MHC Class-I-Dependent Immune Privilege: Exploiting the Human Hair Follicle as a Model*. The American Journal of Pathology, 2004. **164**(2): p. 623-634.
79. Vidali, S., et al., *Hypothalamic-Pituitary-Thyroid Axis Hormones Stimulate Mitochondrial Function and Biogenesis in Human Hair Follicles*. Journal of Investigative Dermatology, 2014. **134**(1): p. 33-42.
80. Schneider, M.R., R. Schmidt-Ullrich, and R. Paus, *The Hair Follicle as a Dynamic Miniorgan*. Current Biology, 2009. **19**(3): p. R132-R142.
81. Foitzik, K., et al., *Human Scalp Hair Follicles Are Both a Target and a Source of Prolactin, which Serves as an Autocrine and/or Paracrine Promoter of Apoptosis-Driven Hair Follicle Regression*. The American Journal of Pathology, 2006. **168**(3): p. 748-756.

82. Langan, E.A., et al., *Mind the (Gender) Gap: Does Prolactin Exert Gender and/or Site-Specific Effects on the Human Hair Follicle?* Journal of Investigative Dermatology, 2010. **130**(3): p. 886-891.
83. Kobayashi, H., et al., *A role of melatonin in neuroectodermal-mesodermal interactions: The hair follicle synthesizes melatonin and expresses functional melatonin receptors.* FASEB Journal, 2005. **19**(12): p. 1710-1712.
84. Matejuk, A., *Skin Immunity.* Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2018. **66**(1): p. 45-54.
85. Martinon, F., A. Mayor, and J. Tschopp, *The inflammasomes: guardians of the body.* Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 229-65.
86. Dieu-Nosjean, M.C., et al., *Macrophage inflammatory protein 3alpha is expressed at inflamed epithelial surfaces and is the most potent chemokine known in attracting Langerhans cell precursors.* J Exp Med, 2000. **192**(5): p. 705-18.
87. Albanesi, C., et al., *Keratinocytes in inflammatory skin diseases.* Curr Drug Targets Inflamm Allergy, 2005. **4**(3): p. 329-34.
88. Miller, L.S., *Toll-like receptors in skin.* Adv Dermatol, 2008. **24**: p. 71-87.
89. Nickoloff, B.J. and L.A. Turka, *Immunological functions of non-professional antigen-presenting cells: new insights from studies of T-cell interactions with keratinocytes.* Immunol Today, 1994. **15**(10): p. 464-9.
90. Black, A.P., et al., *Human keratinocyte induction of rapid effector function in antigen-specific memory CD4+ and CD8+ T cells.* Eur J Immunol, 2007. **37**(6): p. 1485-93.
91. Shklovskaya, E., et al., *Langerhans cells are precommitted to immune tolerance induction.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(44): p. 18049-54.
92. Gomez de Agüero, M., et al., *Langerhans cells protect from allergic contact dermatitis in mice by tolerizing CD8(+) T cells and activating Foxp3(+) regulatory T cells.* J Clin Invest, 2012. **122**(5): p. 1700-11.
93. Kubo, A., et al., *External antigen uptake by Langerhans cells with reorganization of epidermal tight junction barriers.* J Exp Med, 2009. **206**(13): p. 2937-46.
94. Nakajima, S., et al., *Langerhans cells are critical in epicutaneous sensitization with protein antigen via thymic stromal lymphopoietin receptor signaling.* J Allergy Clin Immunol, 2012. **129**(4): p. 1048-55.e6.
95. Bedoui, S., et al., *Cross-presentation of viral and self antigens by skin-derived CD103+ dendritic cells.* Nat Immunol, 2009. **10**(5): p. 488-95.
96. Auffray, C., M.H. Sieweke, and F. Geissmann, *Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells.* Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 669-92.
97. Tsai, M., M. Grimbaldston, and S.J. Galli, *Mast cells and immunoregulation/immunomodulation.* Adv Exp Med Biol, 2011. **716**: p. 186-211.
98. Biggs, L., et al., *Evidence that vitamin D(3) promotes mast cell-dependent reduction of chronic UVB-induced skin pathology in mice.* J Exp Med, 2010. **207**(3): p. 455-63.
99. Hershko, A.Y. and J. Rivera, *Mast cell and T cell communication; amplification and control of adaptive immunity.* Immunol Lett, 2010. **128**(2): p. 98-104.

100. Clark, R.A., et al., *The vast majority of CLA+ T cells are resident in normal skin.* J Immunol, 2006. **176**(7): p. 4431-9.
101. Edele, F., et al., *Cutting edge: instructive role of peripheral tissue cells in the imprinting of T cell homing receptor patterns.* J Immunol, 2008. **181**(6): p. 3745-9.
102. Foster, C.A., et al., *Human epidermal T cells predominantly belong to the lineage expressing alpha/beta T cell receptor.* J Exp Med, 1990. **171**(4): p. 997-1013.
103. Nomura, T., K. Kabashima, and Y. Miyachi, *The panoply of alphabeta T cells in the skin.* J Dermatol Sci, 2014. **76**(1): p. 3-9.
104. Vukmanovic-Stejic, M., et al., *The kinetics of CD4+Foxp3+ T cell accumulation during a human cutaneous antigen-specific memory response in vivo.* J Clin Invest, 2008. **118**(11): p. 3639-50.
105. Tomura, M., et al., *Activated regulatory T cells are the major T cell type emigrating from the skin during a cutaneous immune response in mice.* J Clin Invest, 2010. **120**(3): p. 883-93.
106. Streilein, J.W., *Skin-associated lymphoid tissues (SALT): origins and functions.* J Invest Dermatol, 1983. **80 Suppl**: p. 12s-16s.
107. Ono, S. and K. Kabashima, *Proposal of inducible skin-associated lymphoid tissue (iSALT).* Exp Dermatol, 2015. **24**(8): p. 630-1.
108. Hayday, A. and R. Tigelaar, *Immunoregulation in the tissues by gammadelta T cells.* Nat Rev Immunol, 2003. **3**(3): p. 233-42.
109. Kronenberg, M., *Toward an understanding of NKT cell biology: progress and paradoxes.* Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 877-900.
110. Jameson, J.M., et al., *Regulation of skin cell homeostasis by gamma delta T cells.* Front Biosci, 2004. **9**: p. 2640-51.
111. Bergstresser, P.R., et al., *Origin and function of Thy-1+ dendritic epidermal cells in mice.* J Invest Dermatol, 1985. **85**(1 Suppl): p. 85s-90s.
112. Kobayashi, T., R.R. Ricardo-Gonzalez, and K. Moro, *Skin-Resident Innate Lymphoid Cells - Cutaneous Innate Guardians and Regulators.* Trends Immunol, 2020. **41**(2): p. 100-112.
113. Kobayashi, T., et al., *Homeostatic Control of Sebaceous Glands by Innate Lymphoid Cells Regulates Commensal Bacteria Equilibrium.* Cell, 2019. **176**(5): p. 982-997.e16.
114. Rak, G.D., et al., *IL-33-Dependent Group 2 Innate Lymphoid Cells Promote Cutaneous Wound Healing.* J Invest Dermatol, 2016. **136**(2): p. 487-496.
115. Shipman, W.D., et al., *A protective Langerhans cell-keratinocyte axis that is dysfunctional in photosensitivity.* Sci Transl Med, 2018. **10**(454).
116. Linehan, J.L., et al., *Non-classical Immunity Controls Microbiota Impact on Skin Immunity and Tissue Repair.* Cell, 2018. **172**(4): p. 784-796.e18.
117. Naik, S., et al., *Compartmentalized Control of Skin Immunity by Resident Commensals.* Science, 2012. **337**(6098): p. 1115-1119.
118. Chen, Y.E., M.A. Fischbach, and Y. Belkaid, *Skin microbiota–host interactions.* Nature, 2018. **553**(7689): p. 427-436.
119. Polak-Witka, K., et al., *The role of the microbiome in scalp hair follicle biology and disease.* Exp Dermatol, 2020. **29**(3): p. 286-294.
120. Vogt, A., et al., *Follicular targeting--a promising tool in selective dermatotherapy.* J Invest Dermatol Symp Proc, 2005. **10**(3): p. 252-5.

121. Divito, S.J. and T.S. Kupper, *Inhibiting Janus kinases to treat alopecia areata*. Nat Med, 2014. **20**(9): p. 989-90.
122. Paus, R., S. Bulfone-Paus, and M. Bertolini, *Hair Follicle Immune Privilege Revisited: The Key to Alopecia Areata Management*. J Investig Dermatol Symp Proc, 2018. **19**(1): p. S12-s17.
123. Engelhardt, B., P. Vajkoczy, and R.O. Weller, *The movers and shapers in immune privilege of the CNS*. Nature Immunology, 2017. **18**(2): p. 123-131.
124. Gilhar, A., et al., *Autoimmune disease induction in a healthy human organ: a humanized mouse model of alopecia areata*. J Invest Dermatol, 2013. **133**(3): p. 844-847.
125. Harel, S., et al., *Pharmacologic inhibition of JAK-STAT signaling promotes hair growth*. Science Advances, 2015. **1**(9): p. e1500973.
126. Leonard, W.J. and J.J. O'Shea, *Jaks and STATs: biological implications*. Annu Rev Immunol, 1998. **16**: p. 293-322.
127. Bernink, J., J. Mjosberg, and H. Spits, *Th1- and Th2-like subsets of innate lymphoid cells*. Immunol Rev, 2013. **252**(1): p. 133-8.
128. Segura, E. and J.A. Villadangos, *Antigen presentation by dendritic cells in vivo*. Curr Opin Immunol, 2009. **21**(1): p. 105-10.
129. Wang, J.H. and E.L. Reinherz, *Structural basis of T cell recognition of peptides bound to MHC molecules*. Mol Immunol, 2002. **38**(14): p. 1039-49.
130. Messaoudi, I., et al., *Direct link between mhc polymorphism, T cell avidity, and diversity in immune defense*. Science, 2002. **298**(5599): p. 1797-800.
131. Gaur, L.K. and G.T. Nepom, *Ancestral major histocompatibility complex DRB genes beget conserved patterns of localized polymorphisms*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(11): p. 5380-3.
132. Torres, B.A., et al., *Superantigen enhancement of specific immunity: antibody production and signaling pathways*. J Immunol, 2002. **169**(6): p. 2907-14.
133. Fernando, M.M., et al., *Defining the role of the MHC in autoimmunity: a review and pooled analysis*. PLoS Genet, 2008. **4**(4): p. e1000024.
134. *Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. The MHC sequencing consortium*. Nature, 1999. **401**(6756): p. 921-3.
135. Hofstetter, A.R., et al., *Diverse roles of non-diverse molecules: MHC class Ib molecules in host defense and control of autoimmunity*. Curr Opin Immunol, 2011. **23**(1): p. 104-10.
136. Alfonso, C. and L. Karlsson, *Nonclassical MHC class II molecules*. Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 113-42.
137. Bouvier, M., *Accessory proteins and the assembly of human class I MHC molecules: a molecular and structural perspective*. Mol Immunol, 2003. **39**(12): p. 697-706.
138. Basler, M., C.J. Kirk, and M. Groettrup, *The immunoproteasome in antigen processing and other immunological functions*. Curr Opin Immunol, 2013. **25**(1): p. 74-80.
139. Ackerman, A.L. and P. Cresswell, *Cellular mechanisms governing cross-presentation of exogenous antigens*. Nat Immunol, 2004. **5**(7): p. 678-84.

140. Lankat-Buttgereit, B. and R. Tampe, *The transporter associated with antigen processing: function and implications in human diseases*. *Physiol Rev*, 2002. **82**(1): p. 187-204.
141. Hammer, G.E., et al., *In the absence of aminopeptidase ERAAP, MHC class I molecules present many unstable and highly immunogenic peptides*. *Nat Immunol*, 2007. **8**(1): p. 101-8.
142. Li, P., et al., *Compartmentalization of class II antigen presentation: contribution of cytoplasmic and endosomal processing*. *Immunol Rev*, 2005. **207**: p. 206-17.
143. Gregers, T.F., et al., *The cytoplasmic tail of invariant chain modulates antigen processing and presentation*. *Eur J Immunol*, 2003. **33**(2): p. 277-86.
144. Mellins, E.D. and L.J. Stern, *HLA-DM and HLA-DO, key regulators of MHC-II processing and presentation*. *Curr Opin Immunol*, 2014. **26**: p. 115-22.
145. Borrego, F., et al., *Structure and function of major histocompatibility complex (MHC) class I specific receptors expressed on human natural killer (NK) cells*. *Mol Immunol*, 2002. **38**(9): p. 637-60.
146. Boyington, J.C., et al., *Crystal structure of an NK cell immunoglobulin-like receptor in complex with its class I MHC ligand*. *Nature*, 2000. **405**(6786): p. 537-43.
147. Vivier, E., et al., *Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells*. *Science*, 2011. **331**(6013): p. 44-9.
148. Beziat, V., et al., *CMV drives clonal expansion of NKG2C+ NK cells expressing self-specific KIRs in chronic hepatitis patients*. *Eur J Immunol*, 2012. **42**(2): p. 447-57.
149. Chung, A.W., et al., *Rapid degranulation of NK cells following activation by HIV-specific antibodies*. *J Immunol*, 2009. **182**(2): p. 1202-10.
150. Gonzalez, S., V. Groh, and T. Spies, *Immunobiology of human NKG2D and its ligands*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2006. **298**: p. 121-38.
151. Steinle, A., et al., *Interactions of human NKG2D with its ligands MICA, MICB, and homologs of the mouse RAE-1 protein family*. *Immunogenetics*, 2001. **53**(4): p. 279-87.
152. Mizuki, N., et al., *Triplet repeat polymorphism in the transmembrane region of the MICA gene: a strong association of six GCT repetitions with Behcet disease*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(4): p. 1298-303.
153. Frigoul, A. and M.-P. Lefranc, *MICA: Standardized IMGT allele nomenclature, polymorphisms and diseases*. *Recent Res. Devel. Human Genet.*, 2005(3): p. 95-145.
154. Petukhova, L., et al., *Genome-wide association study in alopecia areata implicates both innate and adaptive immunity*. *Nature*, 2010. **466**(7302): p. 113-7.
155. Barahmani, N., et al., *Major histocompatibility complex class I chain-related gene A polymorphisms and extended haplotypes are associated with familial alopecia areata*. *J Invest Dermatol*, 2006. **126**(1): p. 74-8.
156. Lee, Y.H. and G.G. Song, *Associations between major histocompatibility complex class I chain-related gene A polymorphisms and susceptibility to Behcet's disease. A meta-analysis*. *Z Rheumatol*, 2015. **74**(8): p. 714-21.
157. Song, G.G., J.H. Kim, and Y.H. Lee, *Associations between the major histocompatibility complex class I chain-related gene A transmembrane*

- (MICA-TM) polymorphism and susceptibility to psoriasis and psoriatic arthritis: a meta-analysis. *Rheumatol Int*, 2014. **34**(1): p. 117-23.
158. Tian, W., et al., [Polymorphism of short tandem repeat of exon 5 of MHC class-I chain related gene A and association with nasopharyngeal carcinoma in a southern Chinese population]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*, 2005. **22**(3): p. 309-12.
 159. Touitou, I., et al., *The MICA region determines the first modifier locus in familial Mediterranean fever*. *Arthritis Rheum*, 2001. **44**(1): p. 163-9.
 160. Alizadeh, B.Z., et al., *MICA marks additional risk factors for Type 1 diabetes on extended HLA haplotypes: an association and meta-analysis*. *Mol Immunol*, 2007. **44**(11): p. 2806-12.
 161. Lee, Y.H., et al., *Meta-analysis of the association between functional MICA-TM polymorphisms and systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis*. *Z Rheumatol*, 2015. **74**(2): p. 146-52.
 162. Ji, M., et al., *MICA polymorphisms and cancer risk: a meta-analysis*. *Int J Clin Exp Med*, 2015. **8**(1): p. 818-26.
 163. Onyeaghala, G., et al., *Association between MICA polymorphisms, s-MICA levels, and pancreatic cancer risk in a population-based case-control study*. *PLoS One*, 2019. **14**(6): p. e0217868.
 164. Martinez-Chamorro, A., et al., *MICA*A4 protects against ulcerative colitis, whereas MICA*A5.1 is associated with abscess formation and age of onset*. *Clin Exp Immunol*, 2016. **184**(3): p. 323-31.
 165. Kianto, U., et al., *HLA-B12 in alopecia areata*. *Arch Dermatol*, 1977. **113**(12): p. 1716.
 166. Hacham-Zadeh, S., et al., *HLA and alopecia areata in Jerusalem*. *Tissue Antigens*, 1981. **18**(1): p. 71-4.
 167. Aliagaoglu, C., et al., *Association between alopecia areata and HLA Class I and II in Turkey*. *J Dermatol*, 2005. **32**(9): p. 711-4.
 168. Kavak, A., et al., *HLA in alopecia areata*. *Int J Dermatol*, 2000. **39**(8): p. 589-92.
 169. Xiao, F.L., et al., *Association of HLA class I alleles with alopecia areata in Chinese Hans*. *J Dermatol Sci*, 2006. **41**(2): p. 109-19.
 170. Barbosa, A.M., et al., *Lack of association between alopecia areata and HLA class I and II in a southeastern Brazilian population*. *An Bras Dermatol*, 2016. **91**(3): p. 284-9.
 171. Hardy, G.H., *MENDELIAN PROPORTIONS IN A MIXED POPULATION*. *Science*, 1908. **28**(706): p. 49-50.
 172. Excoffier, L., G. Laval, and D. Balding, *Gametic phase estimation over large genomic regions using an adaptive window approach*. *Hum Genomics*, 2003. **1**(1): p. 7-19.
 173. Wei, F., Y.U. Zhang, and W. Li, *A meta-analysis of the association between Behcet's disease and MICA-A6*. *Biomed Rep*, 2016. **4**(6): p. 741-745.
 174. Wang, Y., et al., *MICB*002 and MICB*014 protect against rheumatoid arthritis, whereas MICA*009 and MICA*A6 are associated with rheumatoid arthritis in a Hainan Han Chinese population*. *Int J Rheum Dis*, 2019. **22**(1): p. 90-95.

175. Diaz-Pena, R., et al., *Ankylosing spondylitis in three Sub-Saharan populations: HLA-B*27 and HLA-B*14 contribution*. Tissue Antigens, 2012. **80**(1): p. 14-5.
176. Reveille, J.D., *An update on the contribution of the MHC to AS susceptibility*. Clin Rheumatol, 2014. **33**(6): p. 749-57.
177. Elizan, T.S., P.I. Terasaki, and M.D. Yahr, *HLA-B14 antigen and postencephalitic Parkinson's disease. Their association in an American-Jewish ethnic group*. Arch Neurol, 1980. **37**(9): p. 542-4.
178. Fuhrer, M., et al., *HLA association is different in children and adults with severe acquired aplastic anemia*. Pediatr Blood Cancer, 2007. **48**(2): p. 186-91.
179. Vita, R., et al., *Certain HLA alleles are associated with stress-triggered Graves' disease and influence its course*. Endocrine, 2017. **55**(1): p. 93-100.
180. Makni, H., et al., *HLA association with nasopharyngeal carcinoma in southern Tunisia*. Mol Biol Rep, 2010. **37**(5): p. 2533-9.

ANEXO